

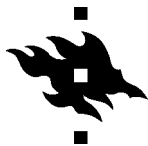
Kvantkemiska studier av modifierade
Zn(II)-kelatorer för medicinska ändamål

Carl-Mikael Suomivuori

Pro gradu -avhandling i biokemi

Biovetenskapliga institutionen

Helsingfors universitet



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- och miljövetenskapliga fakulteten		Laitos – Institution– Department Biovetenskapliga institutionen	
Tekijä – Författare – Author Carl-Mikael Suomivuori, studienummer 013407085			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Kvantkemiska studier av modifierade Zn(II)-kelatorer för medicinska tillämpningar			
Oppiaine – Läroämne – Subject Biokemi			
Työn laji – Arbetets art – Level <i>Pro gradu</i> -avhandling		Aika – Datum – Month and year Februari 2014	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 76
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Fria zinkjoner spelar en patologisk roll i flera dödliga neurodegenerativa sjukdomar såsom amyotrofisk lateralskleros, Alzheimers sjukdom och Parkinsons sjukdom. Konstruktion av Zn(II)-kelatorer är en lovande forskningsinriktning vid utveckling av läkemedel mot dessa sjukdomar. En kelator kan dock förorsaka celledöd om dess zinkaffinitet är för hög. N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmetyl)etylendiamin (TPEN) är en Zn(II)-kelator som kan motverka zinkrelaterade patologier, men dess höga zinkaffinitet utesluter användning av TPEN som läkemedel. I denna avhandling har densitetsfunktionalteoretiska (DFT) beräkningar utförts på TPEN och TPEN-derivat. Målet var att föreslå modifieringar av molekylstrukturen som sänker kelatorns zinkaffinitet till en mindre giftig nivå och som kunde därmed leda till nya läkemedel mot neurodegenerativa tillstånd. Ett ytterligare mål var att utveckla ett beräkningsprotokoll för studier och <i>in silico</i> -konstruktion av Zn(II)-kelatorer. Resultaten tyder på att dispersionskorrigerad DFT som beaktar lösningsmedlet implicit kan ge reaktionsenergier för ligandutbytesreaktioner som stämmer väl överens med experimentella data. Den använda beräkningskemiska metodiken är även lämplig för liknande studier av andra metaller. TPEN:s zinkaffinitet kan sänkas genom att ersätta väten hos kelatorns pyridylringar med elektronattraherande grupper. Även svagt elektrondonerande grupper kan sänka zinkaffiniteten om det förorsakar en konformationsförändring som stabiliserar den fria kelatorn. Genom att ersätta pyridylringarnas kolatomer med kväven kan man också sänka TPEN:s zinkaffinitet. Beräkningsmetodologin borde förbättras i fall man vill tackla mera komplicerade problem såsom studier av komplexeringsenergier för kelatorer med olika denticiteter då lösningsmedelsmolekyler kan spela en mera central roll som en av liganderna.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords neurodegenerativa sjukdomar, zink, kelator, beräkningskemi			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Michael Patzschke, Raúl Mera-Adasme			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Biological and Environmental Sciences		Laitos – Institution – Department Department of Biosciences	
Tekijä – Författare – Author Carl-Mikael Suomivuori, student number 013407085			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Quantum chemical studies of modified Zn(II) chelators for medical applications			
Oppiaine – Läroämne – Subject Biochemistry			
Työn laji – Arbetets art – Level Master's thesis		Aika – Datum – Month and year February 2014	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 76
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Mobile zinc is involved in the pathogenesis of several fatal neurodegenerative diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease. Design of novel Zn(II) chelators is a promising research field in the development of new medical treatments for these diseases. However, depletion of zinc using a high affinity chelator can lead to cell death. The Zn(II) chelator N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN) can reverse some zinc related pathologies, but its high zinc affinity makes it unsuitable for use as a medical treatment. In this thesis, calculations at the density functional theory (DFT) level have been performed on TPEN and TPEN derivatives. The aim was to suggest modifications in the molecular structure which lower the zinc affinity of the chelator to a less toxic level, and which therefore could potentially lead to new medical therapies for neurodegenerative diseases. A further aim was to develop a computational protocol that is suitable for studies and <i>in silico</i> design of Zn(II) chelators. The results show that DFT methods, which include a correction for dispersion forces and which treat the solvent implicitly, can yield free energies for ligand exchange reactions which agree well with experimental data. The employed computational methodology is also suitable for similar studies involving other metals. The zinc affinity of TPEN can be lowered by substituting hydrogens on its pyridyl rings with electron-attracting groups. Substitution with weakly electron-donating groups can also lower the zinc affinity, provided that it results in a conformational change which stabilises the free chelator. Substitution of carbon atoms with nitrogens on the pyridyl rings also lowers the zinc affinity. The computational methodology needs improvement if one wishes to address more complicated problems, such as studies of complexation energies for chelators with varying denticities, in which solvent molecules may play a more significant role as one of the ligands.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords neurodegenerative diseases, zinc, chelator, computational chemistry			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Michael Patzschke, Raúl Mera-Adasme			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Innehåll

Tack	v
Förkortningar	vii
1 Inledning	1
1.1 Bakgrund och motivering	1
1.1.1 Beräkningsbiokemi	2
1.2 Målet	2
2 Zinkens biologiska kemi	5
2.1 Zinkens kemi	5
2.2 Zink i levande organismer	7
2.2.1 Zinkproteiner	7
2.2.2 Zink inom reglering	9
2.3 Zinkhomeostas	10
2.3.1 Metallotioneiner	11
2.3.2 Transportproteiner	13
2.3.3 Zink som ett nervgift	13
2.3.4 Eliminering av zink	17
3 Kelatorer som läkemedel	19
3.1 Krav för en användbar kelator	20
3.2 Clioquinol och Alzheimers sjukdom	21

3.3	Pyridinderivat	22
3.4	Mot nya kelaterande läkemedel	23
4	Beräkningskemins grunder	25
4.1	Noggrannhet versus beräkningstid	25
4.2	Klassiska metoder	26
4.3	Elektronstrukturmetoder	26
4.3.1	Born-Oppenheimer-approximationen	27
4.3.2	Hartree-Fock-metoden	27
4.4	Densitetsfunktionalteori	29
4.4.1	Olika densitetsfunktionaler	30
4.5	Bassetapproximationen	32
4.6	Modeller för lösningsmedlet	33
4.7	Beräkning av termodynamiska storheter	35
5	Material och metoder	39
5.1	Material	39
5.2	Beräkningskemiska metoder	39
6	Resultat och diskussion	41
6.1	Metodvalidering	41
6.1.1	Komplexering versus utbyte	41
6.1.2	TPEN och DPA	42
6.1.3	Funktioner och basset	43
6.1.4	Beräkningar med implicit lösningsmedelsmodell	44
6.1.5	Behandling av dispersionskrafter	44
6.1.6	Det slutliga protokollet	45
6.2	TPEN och modifierade kelatorer	46
6.2.1	Allmänna observationer	48
6.2.2	Substituenten på pyridylringarna	50
6.2.3	Andra ringstrukturer	56

<i>INNEHÅLL</i>	iii
6.3 Metodologins begränsningar	57
6.3.1 Kelators biologiska effekt och syntes	58
6.3.2 Modifiering av koordinationstalet	58
6.3.3 Protonöverföringsreaktioner	59
7 Sammanfattning och framtidsplaner	61

Tack

Först och främst vill jag tacka mina handledare Michael Patzschke och Raúl Mera-Adasme för deras hjälp och tålamod. Ett särskilt tack går till prof. Dage Sundholm för att ha gett mig tillfället att arbeta i en unik omgivning och för hjälpfulla kommentarer angående avhandlingen. Jag vill dessutom tacka alla mina medarbetare på Svenska Kemen för deras hjälp och sällskap. CSC tackas för beräkningsmässiga resurser.

Jag vill tacka min mamma Lisbeth Blomqvist för all villkorslös stöd genom åren. Jag vill också tacka min pappa Martti Suomivuori för stöden och alla intressanta diskussioner. Jag är tacksam för mina bröder Björn Suomivuori och Mauri Suomivuori för att ha hjälpt mig på otaliga sätt genom åren.

Till sist vill jag tacka min bästa vän och blivande fru Jessica Bergroth. Utan henne vet jag inte vad jag skulle göra!

Förkortningar

Förkortningarna följer engelskspråkig litteratur.

Aβ	amyloid- β -peptid
AD	Alzheimers sjukdom
ALS	amyotrofisk lateralskleros
APP	amyloid- β -prekursorprotein
BOA	Born-Oppenheimer-approximationen
BP86	Becke-Perdew-densitetsfunktionalen från 1986
COSMO	<i>conductor-like screening model</i>
CQ	clioquinol
D3	Grimmes korrektion för dispersionsväxelvekan från 2010
def2	Karlsruhe-baset
DFT	densitetsfunktionalteori
DPA	bis(2-pyridylmetyl)amin
ECP	effektiv kärnpotential
EDTA	etylendiamintetraättiksyra
GGA	<i>generalized gradient approximation</i>
GTO	Gauss-orbital
HF	Hartree-Fock-metoden
HSAB	<i>hard and soft acids and bases</i>
LDA	lokaldensitetsapproximationen
LMP	lysosomal membranpermeabilisering
LTP	<i>long-term potentiation</i> , minnesbildning
MD	molekyldynamik
MT	metallotionein
NBO	<i>natural bond orbital</i>
NO-syntas	kväveoxidsyntas

PD	Parkinsons sjukdom
PKC	proteinkinas C
QSAR	kvantitativt struktur-aktivitet-förhållande
QSPR	kvantitativt struktur-egenskap-förhållande
ROS	reaktiva syreföreningar
RRHO	stel-rotor-harmonisk-oscillator
SE	Schrödingerekvationen
SN	<i>substantia nigra</i>
SOD1	koppar/zink-superoxiddismutas
STO	Slater-orbital
TPA	tris(2-pyridylmetyl)amin
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmetyl)etylendiamin
TPSS	Tao-Perdew-Staroverov-Scuseria-densitetsfunktionalen
ZnF	zinkfinger

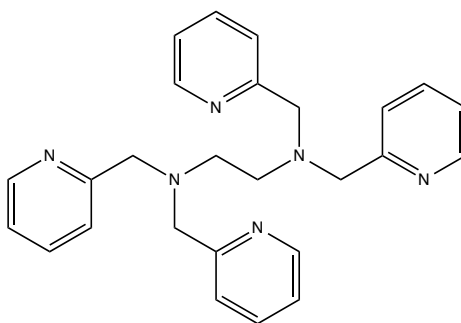
Kapitel 1

Inledning

1.1 Bakgrund och motivering

En hög zinkjonkoncentration i kroppen spelar en patologisk roll i flera allvarliga sjukdomstillstånd, såsom de neurodegenerativa sjukdomarna amyotrofisk lateralskleros (ALS), Alzheimers sjukdom (AD) och Parkinsons sjukdom (PD).¹⁻³ Konstruktion av kelatorer som kan eliminera eller omfördela zink är en lovande och snabbt växande forskningsinriktning vid utveckling av nya läkemedel mot dessa sjukdomar.⁴ På grund av metallens väsentliga fysiologiska uppgifter kan dock eliminering av zink med en kelator vara dödligt.⁵ Därför är det viktigt att den eventuella kelatorns zinkaffinitet inte är för hög.

N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmetyl)etylendiamin (TPEN, Fig. 1.1) är en välkänd zinkkelator som har flera egenskaper som önskas av ett läkemedel mot neurodegenerativa sjukdomar.⁴ Trots att molekylen kan motverka vissa zinkrelaterade patologier,^{6,7} kan den också på grund av sin höga zinkaffinitet (dissocieringskonstanten $K_d = 0,26 \text{ fM}$)⁸ utarma zink från väsentliga metalloproteiner och förorsaka celldöd.⁵ Information om modifieringar som sänker kelatorns zinkaffinitet kunde leda till nya läkemedel för behandling av neurodegenerativa tillstånd. Informationen kunde också vara till nytta vid



Figur 1.1: Den kemiska strukturen för TPEN.

konstruktion av metallsonder som kan användas vid studier av zinkjonens cellbiologi.⁹

1.1.1 Beräkningsbiokemi

Enligt Moore's lag fördubblas datorers kapacitet ungefär varannat år.¹⁰ I och med datorteknologins snabba utveckling har en rent teoretisk behandling av biologiska problem blivit en tillgänglig strategi inom den biokemiska forskningen. Tidskrävande beräkningar kan göras på allt större system då teknologin utvecklas. De kvantitativt noggranna kvantkemiska metoderna kommer att utgöra ett allt värdefullare verktyg i framtiden. Beräkningskemisk metodologi har en särskild betydelse inom läkemedelsutvecklingen, där man kan utföra beräkningar på eventuella läkemedelskandidater före resurs- och tidskrävande studier i laboratoriet påbörjas. De teoretiska metodernas relevans inom forskningen betonades nyligen då Nobelpriset i kemi för år 2013 tilldelades forskare som utvecklat beräkningsbiokemisk metodologi.

1.2 Målet

I denna avhandling har de kvantkemiska densitetsfunktionalteoretiska (DFT) metoderna tillämpats på TPEN och flera av dess derivat. Frågeställningen

för detta arbete var:

- Kan DFT-metoder reproducera experimentella komplexeringsenergier och är de lämpliga för *in silico* -utvärderingar av Zn(II)-kelatorer?
- Hurudana modifieringar kan göras på TPEN för att sänka dess zinkaffinitet till en mindre giftig nivå?

Det slutliga målet var att utröna huruvida DFT-beräkningar kan bidra till utvecklingen av nya läkemedel mot neurodegenerativa sjukdomar. Ett ytterligare mål var att utveckla ett användbart beräkningsprotokoll för studier och konstruktion av metallkelatorer.

Kapitel 2

Zinkens biologiska kemi

2.1 Zinkens kemi

Neutral zinkmetall har elektronkonfigurationen $[\text{Ar}]3d^{10}4s^2$ och befinner sig i grupp 12 i d -blocket i det periodiska systemet. I vattenlösning och i praktiskt taget alla föreningar förlorar zink de yttersta s -elektronerna och då förekommer metallen som divalent Zn(II) -katjon.¹¹ Då det talas om “zink” menas det inom kemin oftast den neutrala metallen, medan i biokemiska sammanhang och hädanefter i detta arbete menas alltid den tvåvärda katjonen.

På grund av det fullständigt besatta d -skalet saknar zink egenskaper som är karaktäristiska för övergångsmetallerna i d -blocket i det periodiska systemet. Faktum är att zink klassificeras ofta som en icke-övergångsmetall.¹² Man kunde därför tänka sig att zink är en kemiskt ointressant metall. Det är dock just dessa så kallade “icke-egenskaper” som ligger bakom zinkens stora förekomst och användbarhet inom biologin.¹³

Det fullständigt besatta d -skalet utesluter $d \rightarrow d$ -övergångar, vilket innebär att zink inte uppvisar de karaktäristiskt färggranna komplexen som övriga övergångsmetaller är kända för. Zink är diamagnetisk eftersom elektronkonfigurationen inte innehåller några oparade elektroner. Egenskaperna

ovan har en praktisk konsekvens eftersom de försvårar spektroskopiska studier av zink. I motsats till de andra biologiskt viktiga metallerna i *d*-blocket uppvisar zink inte någon redoxkemi eftersom dess valens inte avviker från Zn(II).

Zink saknar ligandfälteffekter och koordinationen runt jonen bestäms främst av ligandernas storlek och laddning. Zink uppvisar en större variation i sina koordinationstal och -geometrier än någon annan metall.¹³ Zink övergår lätt från en koordinationsgeometri till en annan och ligandutbyten sker snabbt.¹⁴ Denna flexibilitet är till nytta i katalytiska sammanhang. I koordinationskomplex är zink oftast tetra-, penta- eller hexakoordinerad. Pentakoordination är betydligt vanligare för zink än för de andra metallerna i samma grupp.¹⁵

Zinkjonens lilla radie (0,65 Å) och därmed relativt koncentrerade laddning gör att den är en relativt stark Lewis-syra.¹⁶ I motsats till många andra övergångsmetaller är det svårt att klassificera zink som antingen en hård eller en mjuk syra enligt Pearsons HSAB (*hard and soft acids and bases*)-teori.¹⁷ HSAB-teorin indelar Lewis-syror och -baser i mjuka och hårda. Hårda syror och baser har hög laddningsdensitet och låg polariserbarhet, medan för mjuka syror och baser gäller det motsatta. Grundprincipen är att hårda syror binds oftast till hårda baser och att mjuka syror binds till mjuka baser. Oftast klassificeras zink i detta sammanhang som ett gränsfall mellan de hårda och mjuka syrorna. I stället för att binda till antingen hårda eller mjuka ligander har det visat sig att zink bildar stabila komplex med en blandning av både hårda och mjuka baser.¹³ I praktiken betyder detta att zink koordineras förutom till hårda syreatomer också till mjukare kväve- och svavelatomer.¹¹

2.2 Zink i levande organismer

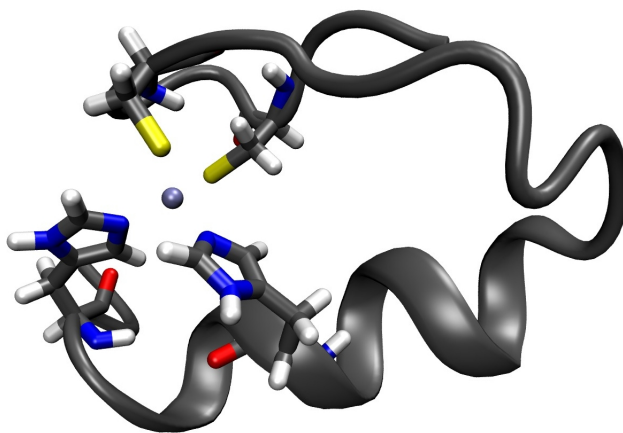
Zink är väsentligt för alla levande organismer och är det vanligaste spårämnet efter järn i människokroppen. Man har uppskattat att en vuxen människa innehåller cirka 3 g zink, vilket motsvarar en koncentration på 0,6 mM.¹⁶ Största delen ($\sim 95\%$) är intracellulär och proteinbunden. Halten fri ("kelaterbar") zinkjon har man via olika metoder uppskattat att ligga mellan 10^{-12} M och 10^{-9} M.¹⁸

Zink spelar både strukturella och katalytiska roller i ett stort antal proteiner och är den enda metallen som förekommer i alla sex fundamentala enzymklasser: oxidoreduktaserna, transferaserna, hydrolaserna, lyaserna, isomeraserna och ligaserna.¹⁹ Kelaterbar zinkjon spelar dessutom viktiga reglerande roller i cellen.¹⁶

2.2.1 Zinkproteiner

Samlingen av alla zinkproteiner i en organism kallas zinkproteomen. Medelst bioinformatiska metoder har man uppskattat att cirka 10 % av människans genom kodar för zinkproteiner. Detta motsvarar minst 3 000 proteiner.²⁰ Identifiering av zinkproteiner genom att endast betrakta sekvensdata har dock avsevärda begränsningar. Det är troligt att andelen zinkproteiner i människogenomen har underskattats.²¹ Detta skulle innebära att zinkproteomen utgör en betydligt större del av genomen än man tidigare trott.

I proteiner är zinkens ligander huvudsakligen kväveatomer från histidinder, syreatomer från aspartat- eller glutamatrester eller svavelatomer från cysteinrester. I enzymer är en av liganderna ofta en vattenmolekyl, särskilt då det är fråga om katalytiska zinksäten. Varierande koordinationsgeometrier förekommer, men den tetrakoordinerade tetraedriska strukturen är den vanligaste.²²



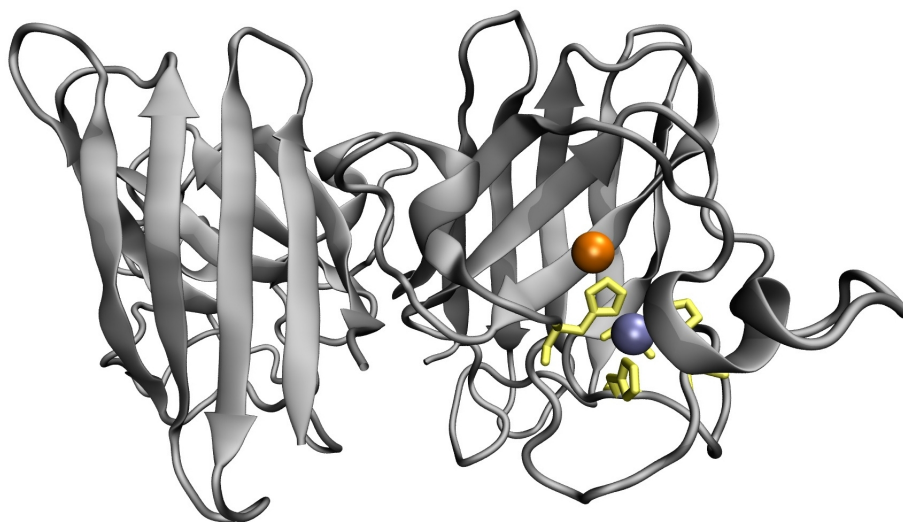
Figur 2.1: En zinkfingerdomän innehållande en zinkjon koordinerad till två histidiner och två cysteiner. Strukturen är från PDB-kod 1ZNF.²⁴ Bilden är gjord med VMD.²⁵

Katalytiska och strukturella roller

Traditionellt har man indelat proteiners zinksäten i strukturella och katalytiska. De katalytiska uppgifterna baserar sig till stor del på jonens relativt starka Lewis-surhet, vilket innebär att zink kan effektivt polarisera ligander. Denna typ av katalys förekommer till exempel i zinkenzymerna kolsyraanhydras och alkoholdehydrogenas.²³

Förutom i katalytiska roller är zink nödvändig för veckning och upprätthållande av den nativa strukturen hos ett stort antal proteiner. En viktig proteinfamilj med strukturell zink är zinkfinger (ZnF) -proteinerna, som är transkriptionsfaktorer innehållande en tetrakoordinerad zinkjon (Fig. 2.1).²⁶ I dessa koordineras zinkjonen antingen till fyra histidiner eller också till två histidiner och två cysteiner.¹⁶ Ett ytterligare exempel på ett protein där zink anses spela huvudsakligen en strukturell roll är koppar/zink-superoxiddismutas (SOD1, Fig. 2.2), vilket är ett enzym som avskaffar skadliga superoxidradikaler.¹⁶

Zinkjoner kan även förekomma vid gränsytan mellan två eller flera peptider och kan således agera som en brygga mellan proteiner.²³ Ett exempel



Figur 2.2: Kristallstrukturen för SOD1 (PDB-kod 2C9V).²⁷ På den högra monomeren är Cu- och Zn-jonerna angivna i orange respektive lila. Zinkliganderna är gulfärgade. Bilden är gjord med VMD.²⁵

är kväveoxidsyntas (NO-syntas), som förekommer som en dimer då två monomerer binds till samma zinkjon.²³ Ett ytterligare exempel är insulinhexameren.¹⁴ Denna bildas då tre stycken insulinprotomerer binds till varandra via två zinkjoner.²⁸ Zinksäten vid proteingränsytor kan spela strukturella, katalytiska, reglerande eller patologiska roller.¹⁴

Klassificeringen ovan är dock inte entydig, eftersom strukturell zink kan bidra till katalys och katalytisk zink kan vara viktig för proteinstrukturen. Dessutom har upptäckten av metallens reglerande uppgifter ytterligare gjort den traditionella indelningen oklarare.¹⁴

2.2.2 Zink inom reglering

Zinkhalten reglerar flera processer i cellen. Exempelvis har det visat sig att zink aktiverar neuronisoformen av NO-syntas.²⁹ NO-syntas är en viktig signalförmedlare som är starkt kopplad till cellens oxidativa tillstånd.³⁰ Likaså är ZnF-proteinernas DNA-bindande förmåga beroende av zink, eftersom jonen är nödvändig för deras veckning. Detta innebär att zink har en

genreglerande roll.²³ Hexameriseringen av insulin, som är ett av de mest centrala hormonerna i människokroppen, illustrerar vidare den reglerande rollen som zink kan spela.¹⁴ Ett exempel som belyser den delikata balansen mellan zinkens patologiska och fysiologiska roller finner man hos tumörsuppressorn p53, som är ett zinkprotein och en transkriptionsfaktor.²³ Denna behöver zink för att nå den nativa konformationen, men en för hög zinkhalt kan leda till felveckning och aggregering.²¹ Fri Zn(II)-jon tycks även fungera som en apoptosinhibitor och som en neuromodulator.^{31,32}

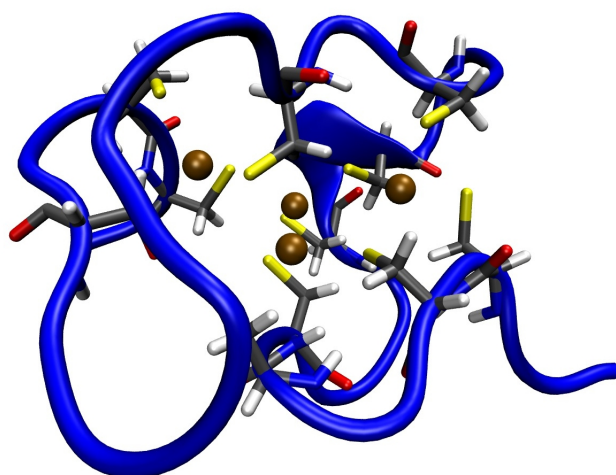
Gluzinerga synapser

En viktig upptäckt angående den fria zinkjonens roll i nervsystemet var att vissa glutamatfrigörande (glutamaterga) neuroner samlar förutom glutamat också zinkjoner i de synaptiska vesiklarna. Vid nervaktivitet frigörs joner i den synaptiska klyftan och då kan den extracellulära zinken modulera flera receptorer och transportörer.³³ Eftersom dessa neuroner frigör både glutamat och zink säger man att synapserna är *gluzinerga*.³⁴

Den exakta rollen som den synaptiska zinken har är ännu oklar och undersökningar av den är ett snabbt växande forskningsområde.⁹ De gluzinerga synapserna förekommer nästan exklusivt i hjärnbarken och i hjärnans limbiska system, vilka anses vara de ställen där minnesbildningen (*long-term potentiation*, LTP) uppstår. Transgena möss som saknar zinktransportproteinet ZnT-3, vilket är ansvarigt för zinkansamlingen i de synaptiska vesiklarna, visar tydliga kognitiva störningar vid en ålder på 6 månader och över.³⁵

2.3 Zinkhomeostas

På grund av zinkens stora betydelse inom biologin är det livsviktigt att upprätthålla en viss zinkhalt i kroppen. Å andra sidan kan zink agera som ett



Figur 2.3: α -domänen av MT-II med fyra bundna Cd(II)-joner (PDB-kod 1MHU).³⁷ Zn(II)-joner binds till samma lägen som Cd(II)-jonerna på bilden då proteinet binder zink. Bilden är gjord med VMD.²⁵

kraftigt nervgift och den anses spela en patologisk roll bland annat i neurodegenerativa sjukdomar och i ischemi.^{34,36} Zinkhalten i en organism kontrolleras därför noggrant för att upprätthålla en hälsosam homeostas. I blodet transporteras zink via serumalbumin, som har en dissocieringskonstant på 45 nM för zink.¹⁴ Förutom metallotioneiner och zinktransportörer, som diskuteras nedan, bör man komma ihåg att alla zinkproteiner kan påverka homeostasen.

2.3.1 Metallotioneiner

Metallotioneiner (MT) är små metallbindande proteiner som karaktäriseras av 20 stycken konserverade cysteinrester.³⁸ De fungerar som metallbuffrar och spelar därmed en viktig roll i att upprätthålla metallhomeostas i kroppen. Proteinerna binder och frigör zink beroende på zinkhalten och det rådande redoxillståndet i cellen. De transporterar också zink mellan olika celler och i det extracellulära utrymmet. De är även ansvariga för överföring av zink mellan metalloproteiner. Metallotioneiner har enligt sin

primärsekvens klassificerats i fyra grupper. MT-III är neuronspecifika och hittas främst i gluzinerga neuroner.³⁹ Dessa är därmed av central betydelse i detta arbete. MT-III binder zink med en effektiv dissocieringskonstant på $1,6 \cdot 10^{-11}$ M.⁴⁰

Metallotioneinerna kan binda upp till sju zinkjoner genom koordination via cysteinresternas svavelatomer.³⁸ Varje zinkjon är på så sätt koordinerad till fyra cysteiner i tetraedriska geometrier (Fig. 2.3). Vissa tiolgrupper agerar som bryggor mellan jonerna. Proteinstrukturen gör att varje jon är i en unik koordinationsomgivning, vilket betyder att de binds med olika affiniteter till proteinet.⁴¹ Bindning av metalljonerna är nödvändigt för proteinernas veckning till den nativa konformationen.

Metallotioneinernas huvuduppgift anses vara att upprätthålla zinkhomeostasen, men de deltar också i cellens redoxreaktioner. MT kan förekomma med varierande metallinnehåll och oxidationstillstånd. Fördelningen av dess olika former varierar med zinkjonkoncentrationen och cellens redoxstillstånd. Eftersom zink alltid har oxidationstillståndet Zn(II), är det inte metalljonen i sig själv utan cysteinernas tiolgrupper som möjliggör redoxkemin.⁴² Proteinernas redoxaktivitet påverkas av antalet metalljoner som är bundna till proteinet och redoxstillståndet påverkar också proteinets förmåga att binda metaller. Då cysteinernas tiolgrupper oxideras frigörs den bundna metallen. Oxidativ stress i cellen kan därmed leda till en ökning i halten kelaterbar zink. MT är således redoxproteiner som påverkar zinkhalten, men de är också zinkproteiner som påverkar cellens redoxstillstånd. I cellen kopplar MT på detta sätt zinkhomeostasen till cellens redoxstillstånd.³⁸

Mängden metallotioneiner i cellen regleras på en transkriptionell nivå i och med att fri zink främjar uttryck av MT.²³ Förutom zink binder metallotioneinerna också andra fria metalljoner, främst koppar. Detta innebär att koppar- och zinkhalterna i en organism beror på varandra. Faktum är att MT binder koppar med en högre affinitet än zink. Eftersom MT-produktion

främjas av halten kelaterbar zink, kan en hög zinkhalt leda till kopparbrist.⁴³

2.3.2 Transportproteiner

Cellens zinkhalt regleras förutom av metallotioneinerna också medelst transportproteiner. I människan kan zinktransportproteiner indelas i två familjer.⁴⁴ ZnT-proteinerna sänker den intracellulära zinkhalten genom att underlätta zinktransport ut ur cellen eller in i intracellulära vesiklar. ZnT-3-proteinet är ansvarigt för Zn(II)-ansamling i de synaptiska vesiklarna hos gluzinerga neuroner.⁴⁵ Zip-familjens proteiner har en motverkande effekt och ökar den intracellulära zinkhalten genom att underlätta zinktransport till cytosolen från det extracellulära utrymmet och från intracellulära vesiklar. Zinktransportörerna liksom metallotioneinerna regleras på en transkriptionell nivå.²³

2.3.3 Zink som ett nervgift

En hög zinkkoncentration är giftigt och förorsakar celldöd bland nerv- och gliaceller både *in vitro* och *in vivo*.⁴⁶ De främsta hypoteserna bakom dess giftighet är att jonen förorsakar exitotoxicitet, oxidativ stress eller att den stör energimetabolin.^{47–49} Hypoteserna utesluter inte varandra, utan det är mera troligt att effekterna är kopplade och att de tillsammans leder till jonens giftighet.⁵⁰

Zink kan ansamlas i mitokondrierna och störa deras funktion. Jonen kan förorsaka att mitokondriernas inre membran blir genomträngligt, vilket kan dissipera membranpotentialen och frigöra apoptosframkallande proteiner.⁵¹ Då organellerna depolariseras kan dessutom reaktiva syreföreningar (*reactive oxygen species*, ROS) frigöras, vilket leder till oxidativ stress. Nervcelldöd kan förorsakas via oxidativ stress också då Zn(II)-halten leder till aktivering av NADPH-oxidas via proteinkinas C (PKC).⁵² Den Zn(II)-aktiverade neuronisoformen av NO-syntas kan dessutom leda till en skadlig nitrosy-

lering av proteiner.²⁹ Vidare kan Zn(II) inhibera det glykolytiska enzymet glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenas (GADPH) och förorsaka en dödlig minskning i nervcellernas ATP-halt.⁵³

Zink kan förorsaka autofagocytotisk celldöd i neuronerna via så kallad lysosomal membranpermeabilisering (LMP).⁵⁴ Vid exponering med väteperoxid eller vid höga halter zinkjon ansamlas metallen i lysosomerna och förorsakar LMP. Detta innebär att lysosomala hydrolaser frigörs till cytosolen, där de nedbryter cellkomponenter och aktiverar apoptos. Zinkjonkoncentrationen utgör därmed en länk mellan oxidativ stress och LMP. Det är oklart varför joner ansamlas i lysosomerna vid oxidativa förhållanden. Zn(II)-kelatorn TPEN kan förhindra både zinkansamlingen i lysosomerna och LMP.⁵⁴

I de följande avsnitten diskuteras zinkjonens roll inom tre av de vanligaste och allvarligaste neurodegenerativa sjukdomarna.

Amyotrofisk lateralskleros

Amyotrofisk lateralskleros (ALS) är en progressiv och dödlig neurodegenerativ sjukdom som attackerar huvudsakligen motorneuronerna. För tillfället finns det inget botemedel mot sjukdomen. ALS leder till förlamning och dödsorsaken är oftast andningssvikt inom 3–5 år från diagnosen.⁵⁵ I 90 % av fallen är sjukdomsorsaken okänd och dessa fall klassificeras som sporadisk ALS (sALS). Resten av fallen förorsakas av nedärvda mutationer och kallas därmed familial ALS (fALS).⁵⁶

Mutationer i proteinet koppar/zink-superoxiddismutas (SOD1) är sjukdomsorsaken i 20 % av fALS-fallen. Proteinets uppgift är att avskaffa skadliga superoxidradikaler i cellen genom att katalysera reaktionen av dem till väteperoxid och molekylärt syre. SOD1 är en homodimer som binder en koppar- och en zinkjon per monomer (Fig. 2.2). Det märkvärdiga är att cirka 150 olika mutationer längs med hela aminosyrasekvensen förorsakar fALS.^{57,58} Man har i flera år försökt utreda på vilket sätt ett så pass stort

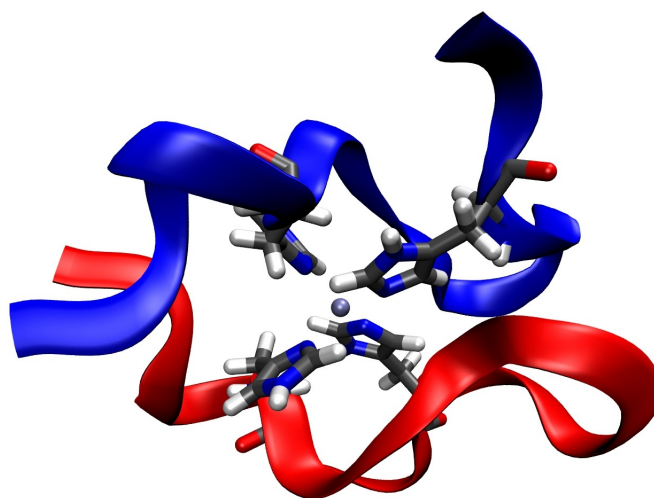
antal mutationer vid olika ställen längs med proteinet kan förorsaka likadana symtom.⁵⁶

Experimentellt tycks det vara klarlagt att sjukdomen inte är relaterad till en störning i enzymets normala katalytiska funktion, utan att mutationerna leder till en ny giftig egenskap. Man har kommit fram till detta genom att påvisa att möss som uttrycker både vildtyp- (wt-SOD1) och muterad SOD1 (m-SOD1) utvecklar ALS-symtom. Dessutom insjuknar inte möss som inte uttrycker SOD1 överhuvudtaget.^{59–62}

Även om patogenesen är oklar finns det flera hypoteser. Man tror att den främst beror på felveckning,⁶³ bildning av reaktiva syreförningar⁶⁴ och metalledshomeostas.¹ Enligt zinkdishedhomeostashypotesen påverkas proteinets zinkaffinitet vid mutation och frigörelse av kelaterbar zink förorsakar patogenesen.¹ En störning i zinkhomeostasen har man kunnat koppla ihop med de andra hypoteserna för SOD1-inducerad ALS, eftersom zink främjar proteinaggregering och spelar en roll i cellsignalering och cellens redoxstillstånd. Experimentellt har man observerat att halten fri zinkjon i neuronerna korrelerar med sjukdomsförloppet hos möss med den ALS-kopplade G93A-mutationen och att behandling med kelatorn TPEN kan förlänga livslängden för de insjuknade mössen.⁷ I andra experiment har man påvisat att överuttryck av neuronspecifik metallotionein III har en skyddande effekt.⁶⁵ Dessutom accelerar underuttryck av metallotioneinerna I, II och III sjukdomsförloppet hos möss.⁶⁶ Detta tyder på att zinkkelatering kunde vara en framgångsrik behandlingsform.

Alzheimers sjukdom

Alzheimers sjukdom (AD) är den vanligaste formen av minnessjukdom idag. Denna obotliga sjukdom är progressiv och slutligen dödlig. AD karaktäriseras av bildning av amyloidplacker, vilka till en stor del består av amyloid- β -peptid ($A\beta$, Fig. 2.4).⁶⁷ $A\beta$ bildas genom klyvning av amyloid- β -prekursor-



Figur 2.4: En Zn(II)-bunden dimer av A β -peptid från råttor (PDB-kod 2LI9).⁶⁸ De olika peptiderna är färgade i rött och blått. I detta fall är liganderna två histidiner per monomer. Bilden är gjord med VMD.²⁵

proteinet (APP). Konsensus idag är att A β -aggregering är en patologisk nyckelfaktor, men det är inte klarlagt varför plackerna leder till sjukdomen.³ Man vet inte heller varför det bildas amyloid endast i neocortex eller varför råttor och möss inte utvecklar sjukdomen vid hög ålder. Det är inte heller klarlagt varför kvinnor och APP-transgena möss har en accelererad amyloidbildning.³⁶ Faktorerna som främjar A β -aggregering är också oklara.

En hypotes för sjukdomsorsaken är att en dishomeostas av kroppens metaller ligger bakom patogenesen.² Uppmärksamheten riktas igen mot zink på grund av dess biologiska roll som en signalförmedlare vid gluzinerga synapser i hjärnbarken och i hippocampus. De gluzinerga synapserna är viktiga för att de anses vara de ställen där minnesbildningen sker, men dessutom är det just här som amyloid först bildas vid AD.³ Zinkjoner som frigörs vid de gluzinerga synapserna tycks spela en viktig roll vid bildning av extracellulär amyloid i musmodeller. Det har visat sig att genetisk deletering av ZnT-3 kan inhibera amyloidbildningen.⁶⁹ Koppar och zink förekommer i höga

halter i amyloidplacker och dessutom har man påvisat att båda metallerna binds direkt till $A\beta$ i plackerna.^{70–73} Experiment har visat att zinkjoner har förmågan att snabbt men reversibelt fälla ut $A\beta$.⁷⁴

Parkinsons sjukdom

Parkinsons sjukdom (PD) är en neurodegenerativ sjukdom som leder till allvarliga symtom i motoriken. Symtomen uppstår då dopaminbildande celler bland *substantia nigra* (SN) dör. Faktorerna som främjar celldöden är okända.³ En av de karaktäristiska egenskaperna vid PD är förekomst av så kallade Lewy-kroppar, vilka är intracellulära inklusionskroppar. Dessa består huvudsakligen av proteinet α -synuklein, som man vet att kan förorsaka sjukdomen vid mutation.³

Man har observerat en ökad zink- och järnhalt i SN vid PD. *In vitro* -studier har påvisat att zink, koppar och järn kan växelverka med α -synuklein och förorsaka dess aggregation.⁷⁵ Fibrillbildning kan inhiberas genom oxidation av metioniner, men tillsättning av Zn(II) har en motsatt effekt.⁷⁶

2.3.4 Eliminering av zink

Även om reducering av cellens zinkhalt är en viktig målsättning för läkemedelsterapier, måste man beakta att en viss zinkhalt behövs för levande organismer. Faktum är att eliminering av zink med en kelator kan också leda till celldöd.³¹ Zinkkelatering med TPEN kan leda till nervcelldöd genom aktivering av kaspas-11 och kaspas-3.⁵ Dessutom kan degeneration ske i dendriterna och axonerna då kelateringen leder till autofagi och en minskning i ATP-halten.⁷⁷ Dessa förlopp måste beaktas vid utveckling av zinkkelaterande molekyler.

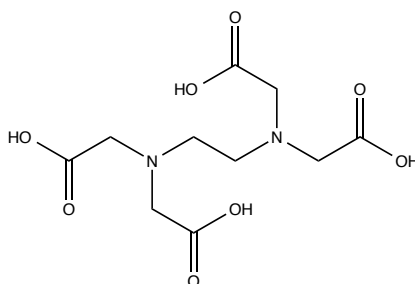
Kapitel 3

Kelatorer som läkemedel

En kelator* är en molekyl som koordinativt binder sig till en metalljon via flere än en donatoratom. Antalet donatoratomer i molekylen anger dess denticitet och man säger exempelvis att en tetrakoordinerande kelator är fyrtandig. Då liganderna härstammar från samma molekyl erhålls ett särskilt stabilt komplex jämfört med situationen då liganderna är separata molekyler. Med andra ord sjunker Gibbs fria energi då ett komplex bestående av flera entandiga ligander utbyts till ett motsvarande kelatkomplex. Detta kallas *kelateffekten*, som beror främst på entropin eftersom antalet produktmolekyler och därmed också antalet frihetsgrader ökar i utbytesreaktionen.

Den främsta medicinska användningen för kelatorer är att binda en giftig metall och eliminera den från kroppen. Exempelvis används kelatorn etylendiamintetraättiksyra (EDTA, Fig. 3.1) vid behandling av olika metallförgiftningar. Idag undersöks dessutom kelatorer som kan både binda en metalljon och till exempel delta i redoxreaktioner.^{4,78} Kelatorer används också vid grundforskning av den fria metalljonens uppgift och läge i en organism.⁹ Ett exempel på detta är metallsonder, som är fluorescerande kelatorer. Det finns ett behov av att utveckla zinkkelatorer för alla de ovannämnda delområdena, medan denna avhandling fokuserar på de medicinska kelato-

*Ordet kelator härstammar från grekiskans ord för klo, *chela*.



Figur 3.1: Strukturen för den neutrala formen av EDTA, som är en medicinskt viktig kelator. EDTA används bland annat vid behandling av olika metallförgiftningar.

rerna som eliminerar eller omfördelar fria zinkjoner.

3.1 Krav för en användbar kelator

En användbar medicinsk kelator måste ha vissa egenskaper. Kelatorn måste vid fysiologiskt pH bindas specifikt till metallen i fråga, i detta fall till zink, men den bör inte kelatera andra biometaller. För att utreda metallspecifiteten används ofta HSAB (*hard and soft acids and bases*) -teorin.¹⁷ En zinkkelator bör med andra ord ha en högre affinitet för zink än för andra fria metaller i kroppen. Som diskuterades tidigare i avhandlingen, är det dock ytterst viktigt att kelatorn inte binder metallen så hårt att cellen töms på zink. Det är inte klart hur man bedömer vilken metallaffinitet som är lämplig.⁹ En möjlig strategi är att försöka reproducera metalloproteiners eller andra kelatorers zinkaffinitet.

Vid studier av metallens cellbiologi bör komplexeringsreaktionen ske relativt snabbt, eftersom zinkhalter i synapser kan förändras snabbt. Vid extracellulära tillämpningar brukar kelatorn ofta vara negativt laddad för att hålla den kvar i det extracellulära utrymmet.⁹ Vid intracellulära applikationer måste kelatorn vara tillräckligt hydrofob för att kunna passera cellmembranet, men den bör ändå vara tillräckligt hydrofil för att inte aggregera.

Om kelatorn är ämnad som ett läkemedel mot neurodegenerativa sjuk-

domar är det viktigt att den kan passera blod-hjärnbarriären. Det finns flera sätt att bestämma denna förmåga, men ett sätt är att minst tre kriterier av Lipinskis femregel uppfylls:⁷⁹

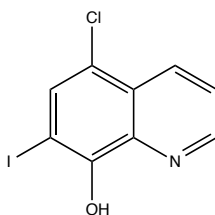
1. molekylvikten är under 500
2. logaritmen av fördelningskoefficienten för oktanol/vatten är under 5
3. antalet vätebindningsdonorer är färre än 5
4. antalet vätebindningsacceptorer är färre än 10.

Om avsikten är att omfördela metallen är det idealt att varken den fria kelatorn eller komplexet har en nettoladdning. Detta är möjligt om molekylen innehåller dissocierbara protoner som lossnar när metalljonen binder till kelatorn. Om protonerna sitter på kelatorns donoratomer kan de dock leda till en långsammare komplexering.⁹

Det är önskvärt att kelatorn är icke-giftig, men med tanke på hur allvarliga och obotliga de neurodegenerativa sjukdomarna är kan vissa giftiga effekter tolereras. Faktum är att man måste högst sannolikt kompromissa mellan önskade och oönskade egenskaper i vilket fall som helst. Till exempel kan en hexakoordinerande ligand på grund av steriska orsaker ha en högre specifitet för en viss metall än en kelator med färre donoratomer, men då har molekylen också en sämre förmåga att passera blod-hjärnbarriären på grund av den ökade molekylvikten.

3.2 Clioquinol och Alzheimers sjukdom

Intresset för att använda kelationsterapi mot neurodegenerativa sjukdomar ökade betydligt efter upptäckten att koppar- och zinkkelatorn 5-klor-7-jod-8-hydroxikinolin (clioquinol, CQ, Fig. 3.2) minskade A β -deposition med nästan 50 % i transgena musmodeller av AD.⁸⁰ Clioquinol var lovande vid kliniska studier, men dess giftighet och syntetiska svårigheter ledde till att

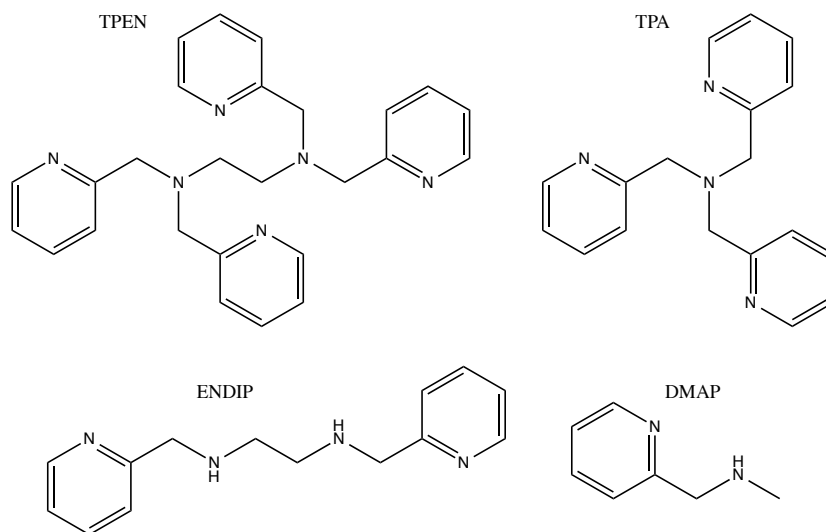


Figur 3.2: Strukturen för clioquinol (CQ). CQ och dess lovande resultat vid behandling av AD väckte intresset för att använda kelationsterapi vid behandling av neurodegenerativa sjukdomar.

man måste avsluta studierna och ge upp tanken på att använda CQ som läkemedel mot AD. Den lämpliga metallaffiniteten (dissocieringskonstanten för $[\text{Zn(II)(CQ)}_2]$ -komplexet är $1,4 \cdot 10^{-9} \text{ M}^2$)⁸¹ och CQ:s lipofila egenskaper initierade utvecklingen av relaterade men mindre giftiga molekyler. PBT2 är en molekyl som är analog till CQ. Den undersöks nu som ett eventuellt läkemedel mot AD.⁸²

3.3 Pyridinderivat

TPEN har förmågan att passera blod-hjärnbarriären och binder zink specifikt via dess mjuka kväveatomer.⁴ TPEN:s fördelaktiga egenskaper har lett till att man undersökt andra relaterade molekyler (Fig. 3.3). Det största problemet med TPEN är den höga zinkaffiniteten som förorsakar zinkbrist och apoptos. Ett möjligen fungerande tillvägagångssätt är att använda molekyler som liknar TPEN, men har färre donoratomer. På detta sätt har flera kelatorer föreslagits. N,N-bis(2-pyridylmetyl)etylendiamin (ENDIP) och N-metyl-(1-pyridylmetyl)amin (DMAP) är en fyrtandig respektive tvåtandig ligand (Fig. 3.3), som har tagits fram som potentiella läkemedel mot AD.⁸³ Huang och medarbetare har år 2013 föreslagit den fyrtandiga kelatorn tris(2-pyridylmetyl)amin (TPA, Fig. 3.3) som ett hjälpmedel vid undersökning av mobil zink.⁸⁴ TPA har en lägre metallaffinitet än TPEN. Den är mindre



Figur 3.3: TPEN och andra pyridinderivat vilka kan användas som kelatorer.

giftig och binder dessutom zink snabbare. Man vet ännu inte huruvida TPA är lämplig som läkemedel.

3.4 Mot nya kelaterande läkemedel

Konstruktion eller identifiering av kelatorer som har alla de ovannämnda önskade egenskaperna är ingen trivial uppgift. Därför är det viktigt att angripa problemet från flera olika håll, samt att anlita både teoretiska och experimentella metoder.

De teoretiska *in silico* -metoderna kan bidra med identifiering av de kandidatföreningar som har en större chans att passera senare och dyrare utvecklingssteg. En strategi är att använda vissa kriterier som filter vid sökning i medicindatabaser. Ofta utnyttjas även statistiska regressionsanalyser såsom kvantitativt struktur-aktivitet-förhållande (QSAR) och kvantitativt struktur-egenskap-förhållande (QSPR).³⁰ Exempelvis har Mousavi nyligen föreslagit en QSPR-metod med vilken man kan förutsäga potentiella medicinska zinkkelatorer.⁸⁵ Detta tillvägagångssätt har dock inte utnyttjats i denna avhandling.

Ett mindre utnyttjat alternativ är teoretisk molekylmodellering medelst kvantkemiska beräkningar. Rodríguez-Rodríguez och medarbetare har föreslagit ett *in silico* -protokoll för identifiering av potentiella kelatorer.⁸⁶ De föreslog en kombination av kemisk intuition, sökning i databaser och kvantkemiska beräkningar. Rimola *et al.* har med hjälp av densitetsfunktionalteoretiska (DFT) beräkningar studerat hur metallaromaticitet inverkar på bindningskonstanten för kopparkelatorer vid behandling av AD.⁸⁷ Hancock och medarbetare har också använt DFT-beräkningar i sina undersökningar av hur ringstorleken hos polyaminkelatorer påverkar metallspezifiteten.⁸⁸ En undersökning av pyridylgrupper som ligander har nyligen publicerats av Hancock.⁸⁹ Den första kvantkemiska studien av hur olika substituenten påverkar TPEN:s zinkaffinitet presenteras i denna avhandling.

Kapitel 4

Beräkningskemins grunder

Experimentella studier av kemiska processer på atomär nivå är ofta omöjliga. Detta gäller i högre grad för komplexa biologiska system. Inom beräkningskemin bygger man en modell av det kemiska problemet med hjälp av fysikens grundlagar. Därefter kan man undersöka modellen med en mycket hög noggrannhet och tillförlitlighetsnivå.

4.1 Noggrannhet versus beräkningstid

Beräkningskemi kan utföras på olika teorinivåer som uppnår en varierande noggrannhet. Ju större noggrannhet som önskas, desto längre kommer beräkningarna i allmänhet att ta. Detta innebär att de noggrannaste teoretiska metoderna kan endast tillämpas på små system som innehåller få atomer. Genom att introducera approximationer kan beräkningstiden förkortas, men då påverkas också resultatets tillförlitlighet. Teorinivån måste därmed anpassas till problemet i fråga så att en vettig kompromiss mellan beräkningstid och noggrannhet uppnås.

4.2 Klassiska metoder

I de så kallade molekylodynamiska (MD) metoderna betraktas atomerna som sfäriska partiklar med en viss massa, medan kemiska bindningar modelleras som fjädrar. Molekylernas egenskaper studeras genom att numeriskt lösa atomernas rörelseekvationer enligt den klassiska mekanikens lagar. Parametrarna som beskriver de olika atomerna och kemiska bindningarna bestäms experimentellt eller med hjälp av beräkningar utförda på en noggrannare teorinivå.

Fördelen med de klassiska metoderna är att de är väldigt snabba, vilket innebär att de kan användas vid modellering och simulering av stora system innehållande flera tusen atomer. De ger också insikter i molekylers tidsberoende rörelser, vilka är ofta problematiska att studera medelst andra metoder. Däremot beaktas inte molekylernas elektronstruktur överhuvudtaget, vilket är den allvarligaste nackdelen med MD-metoderna. Detta innebär att kemiska bindningar kan varken brytas eller bildas.

4.3 Elektronstrukturmetoder

Klassiska metoder kan inte beskriva elektronstrukturen ens på en kvalitativ nivå. För att kunna fysikaliskt behandla elektronerna behövs kvantmekaniken. Grunden för de kvantkemiska metoderna är lösning av Schrödingerekvationen (SE), som är kvantmekanikens rörelseekvation. Den tidsberoende formen av denna egenvärdesekvation kan skrivas som

$$\hat{H}\Psi = E\Psi, \quad (4.1)$$

där \hat{H} är Hamiltonoperatoren, Ψ är vågfunktionen och E är systemets energi. Vågfunktionen innehåller all information om systemet. Man kan dock lösa Ekv. 4.1 analytiskt endast för ett fåtal enkla system, medan lösningen av SE för molekyler kräver approximationer.

4.3.1 Born-Oppenheimer-approximationen

Eftersom elektronen är ungefär 1 800 gånger lättare än en proton, kan man anta att elektronernas lägen anpassas omedelbart till de tyngre kärnornas rörelse. Denna approximation kallas Born-Oppenheimer-approximationen (BOA), som möjliggör separation av SE till en elektronisk del och en kärndel.⁹⁰ Med hjälp av BOA kan den icke-relativistiska Hamiltonoperatoren för den elektroniska SE i Ekv. 4.1 skrivas (i atomära enheter*)

$$\hat{H} = - \sum_i^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_i^N \sum_a^N \frac{Z_a}{|\mathbf{R}_a - \mathbf{r}_i|} + \sum_i^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|}, \quad (4.2)$$

där den första termen representerar elektronernas kinetiska energi, den mittersta termen representerar potentialenergin för attraktionen mellan elektronerna och kärnorna och den sista termen representerar potentialenergin för repulsionen mellan elektronerna. BOA gör det möjligt att upprita potentialenergiytan för molekyler. Molekylens jämviktsstruktur kan sedan identifieras som den lägsta punkten på potentialenergiytan. Faktum är att utan BOA vore det omöjligt att definiera en molekylstruktur överhuvudtaget. BOA är en ytterst kraftfull approximation, men för att göra beräkningar på större system måste ytterligare approximationer tillgripas.

4.3.2 Hartree-Fock-metoden

En viktig konsekvens av Pauliprincipen är att vågfunktionen för en molekyl måste vara antisymmetrisk under byte av två elektroner. Detta betyder att vågfunktionen måste byta förtecken vid byte av två elektroners koordinater. På Hartree-Fock (HF) -nivån beaktas detta genom att uttrycka den molekylära vågfunktionen som en Slaterdeterminant (SD) bestående av

*För atomära enheter gäller $m_e = e = \hbar = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} = 1$, där m_e är elektronmassan, e är elementärladdningen, \hbar är Plancks reducerade konstant och $\frac{1}{4\pi\epsilon_0}$ är Coulombkonstanten.

en-elektron-vågfunktioner, som kallas spinnorbitaler $\chi_i(\mathbf{x}_j)$:⁹¹

$$\Phi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1(\mathbf{x}_1) & \chi_2(\mathbf{x}_1) & \dots & \chi_N(\mathbf{x}_1) \\ \chi_1(\mathbf{x}_2) & \chi_2(\mathbf{x}_2) & \dots & \chi_N(\mathbf{x}_2) \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \chi_1(\mathbf{x}_N) & \chi_2(\mathbf{x}_N) & \dots & \chi_N(\mathbf{x}_N) \end{vmatrix}. \quad (4.3)$$

En given spinnorbital förekommer i en kolumn av determinanten, medan koordinaterna för en given elektron förekommer radvis. När man kastar om två kolumner eller rader i determinanten byts dess förtecken. På detta sätt uppfylls Paulis antisymmetrivillkor för den molekylära vågfunktionen.

Lösningen till SE underlättas betydligt om repulsionen mellan elektronerna försummas helt eller om man beaktar den på ett genomsnittligt sätt. På HF-nivån behandlas elektron-elektron-repulsionen inte explicit, utan den beaktas genom att man antar att varje elektron rör sig i ett medelfält skapat av de övriga elektronerna. Detta är den så kallade medelfältapproximationen.^{92–94}

Att representera den molekylära vågfunktionen med en enda Slaterdeterminant är i många fall en relativt grov approximation. I medelfältapproximationen beaktas inte den momentana elektrostatiska repulsionen mellan två elektroner, vilket leder till en avvikelse från den rätta energin. Skillnaden mellan HF-energin och den exakta energin kallas korrelationsenergin.

HF-metoden är av central betydelse inom beräkningskemin, eftersom den går att systematiskt förbättras genom att introducera korrigeringar. Detta utgör grunden för de så kallade post-Hartree-Fock-metoderna. Ett annat alternativ mot noggrannare metoder är att inte utgå från den molekylära vågfunktionen överhuvudtaget, utan att utgå från elektrondensiteten i stället.

4.4 Densitetsfunktionalteori

Eftersom den molekylära vågfunktionen för ett system innehållande N elektroner beror på $4N$ koordinater (tre rymdkoordinater samt en spinnkoordinat för varje elektron), kommer beräkningsbördan för vågfunktionsmetoder att öka exponentiellt med ett ökande antal atomer. Däremot kunde Hohenberg och Kohn bevisa att den elektroniska energin för ett system i sitt grundtillstånd kan entydigt bestämmas (sånär som på en additiv konstant) från elektrondensiteten ρ , som endast beror på 3 rymdkoordinater.⁹⁵ Detta utgör grunden för densitetsfunktionalteorin (DFT), som Walter Kohn tillsammans med John Pople beviljades Nobelpriset i kemi för år 1998.

Analogt med vågfunktionsmetoderna kan totalenergin skrivas som

$$E[\rho] = T[\rho] + V_{ne}[\rho] + V_{ee}[\rho], \quad (4.4)$$

där T betecknar den kinetiska energin och de två återstående termerna betecknar kärn-elektron-attraktionen och elektron-elektron-repulsionen. Tyvärr är den exakta funktionalen[†] som kopplar elektrondensiteten med den elektroniska energin okänd. I princip kunde man med hjälp av DFT utföra beräkningar vars beräkningsbörda stiger linjärt med systemets storlek. I praktiken har dessa (”rena”) DFT-metoder inte ännu nått en användbar noggrannhet, främst på grund av att man inte vet hur man skall behandla den kinetiska energin.

Kohn och Sham föreslog att återinföra orbitaler, vilket var en avgörande faktor för att kunna använda DFT inom beräkningskemin.⁹⁶ I Kohn-Sham-DFT (KS-DFT) löses systemets kinetiska energi under antagandet att elektronerna inte växelverkar med varandra, medan densiteten som används är den exakta grundtillståndsdensiteten. På detta sätt kan största delen av den kinetiska energin behandlas exakt och endast en korrektionsdel måste

[†]En *funktional* är en funktion av en annan funktion. I detta fall är energin en funktion av elektrondensiteten, som i sin tur är en funktion av rymdkoordinaterna.

approximeras. Denna korrektionsdel kallas utbytes-korrelationsfunktionalen E_{XC} .

Nackdelen med KS-DFT är att återinförseln av orbitaler återhämtade också $3N$ -beroendet, vilket innebär att beräkningsbördan är i princip av samma storleksordning som på HF-nivån. Man kan införa ytterligare approximationer, vilka avsevärt för snabbbar beräkningar på DFT-nivån. På DFT-nivån får man dessutom en betydligt bättre noggrannhet än med HF-beräkningar, vilket är huvudorsaken till att DFT är den mest använda kvantkemiska metoden inom beräkningskemin idag.

Trots DFT:s användbarhet finns det också problem. En svaghet är att man inte kan systematiskt förbättra noggrannheten så som med vågfunktionsmetoder. Det är mycket svårt att utvärdera felgränser för DFT-beräkningar, varför det är viktigt att jämföra beräkningarna med experiment eller om möjligt med vågfunktionsmetoder.

Ett annat problem är att KS-DFT har svårigheter att behandla dispersionsväxelvekan. Diverse dispersionskorrektioner har dock framförts. Dessa förbättrar resultaten avsevärt, särskilt för biosystem där dispersionsväxelvekan är viktig. Ett av de mest populära sätten att beakta dispersion är D3-korrektionen som Grimme har föreslagit.⁹⁷ DFT-D3-metoder har använts i denna avhandling.

4.4.1 Olika densitetsfunktionaler

De olika densitetsfunktionalerna som används inom dagens beräkningskemi skiljer sig endast i utbytes-korrelationsfunktionalen. De olika funktionalerna skiljer sig förutom i resultatens tillförlitlighet också i beräkningstid.

Inom lokaldensitetsapproximationen (LDA) används uttryck för utbytes-korrelationsfunktionalen som utgår från att elektrondensiteten är uniform:

$$E_{XC} = \int F(\rho) d\mathbf{r}. \quad (4.5)$$

Betydligt bättre resultat erhålls om utbytes-korrelationsfunktionalen också beror på hur elektrondensiteten förändras. GGA (*generalized gradient approximation*) -funktionaler har också termer som innehåller densitetens gradient i utbytes-korrelationsfunktionalen:

$$E_{XC} = \int F(\rho, \nabla \rho) d\mathbf{r}. \quad (4.6)$$

Ett exempel på en GGA-funktional som gett bra resultat för diverse system är BP86, vilken är en funktional som föreslogs av Becke och Perdew år 1986.^{98,99} BP86-funktionalens väldokumenterade tillförlitliga resultat genom åren är en av orsakerna till att den använts i detta arbete.

Det nästa steget i förbättringen av funktionalerna är att använda meta-GGA-funktionaler, vilka har utbytes-korrelationsfunktionaler som innehåller förutom gradienten också termer med högre ordningens derivator:

$$E_{XC} = \int F(\rho, \nabla \rho, \nabla^2 \rho, \tau) d\mathbf{r}, \quad (4.7)$$

där τ är den kinetiska energidensiteten. Ett exempel på en meta-GGA-funktional är TPSS, vilken föreslogs av Tao, Perdew, Stavorerov och Scuseria år 2003.¹⁰⁰ Denna har gett mycket bra resultat för biologiska system som innehåller övergångsmetaller, vilket är orsaken till att TPSS-funktionalen har huvudsakligen använts i detta arbete.¹⁰¹

Hybridfunktionaler innehåller exakta utbytestermerna härledda på HF-nivån i utbytes-korrelationsfunktionalen, vilket är ett ytterligare sätt att förbättra resultaten. En populär hybridfunktional är B3LYP.^{102,103} Beräkning av HF-utbytesdelen är dock tidskrävande, vilket är en orsak till att hybridfunktionaler inte har använts i detta arbete.

4.5 Bassetapproximationen

Inom kvantkemin uttrycks molekylorbitalerna eller Kohn-Sham-orbitalerna som en linjär kombination av basfunktioner:

$$\Phi_i = \sum_p c_{ip} \chi_p. \quad (4.8)$$

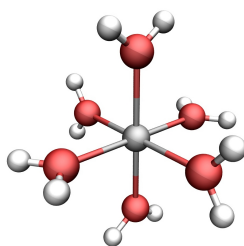
Samlingen basfunktioner bildar tillsammans ett *basset*. Om antalet basfunktioner är oändligt är bassetet fullständigt, vilket innebär att ingen bassetapproximation har gjorts. Vid kvantkemiska studier används dock ett ändligt antal basfunktioner, vilket leder till ett fel som kallas bassetfelet.

Ett sätt att representera bassetet är att använda Slater-orbitaler (STO), som är ett naturligt bra val eftersom de påminner om väteatomens orbitaler och har därmed en klar fysikalisk tolkning. Användningen av STO är dock beräkningsmässigt komplicerat och därför används ofta Gauss-orbitaler (GTO) i stället:

$$\chi_p^l = Y_{l,m}(\theta, \phi) r^l e^{-\gamma r^2}, \quad (4.9)$$

där $Y_{l,m}(\theta, \phi)$ är klotfunktioner, l och m är bi- respektive det magnetiska kvanttalet och r är avståndet mellan elektronen och kärnan där basfunktionen är placerad. Slater-orbitaler kan approximeras som linjära kombinationer av GTO:s.

I allmänhet ökar resultatens tillförlitlighet ju fler basfunktioner som används. Ett minimalt basset innehåller endast en basfunktion per orbital. Dessa basset ger sällan noggranna resultat eftersom det finns inga orbitalfrihetsgrader att justera. Oftast används fler än en funktion per valenselektron. Då säger man att basseten är av dubbel- ζ (DZ), trippel- ζ (TZ) och så vidare kvalitet. För att kunna beskriva elektrondensitetens polariseringseffekter inför man polariseringsfunktioner (P) i bassetet. För att kunna beskriva svaga växelverkningar korrekt krävs också diffusa funktioner. Bassetet som beskriver atomernas jonkärnor har en väldigt liten flexibilitet för att den delen av vågfunktionen är av mindre betydelse. För tyngre element,



Figur 4.1: DFT-optimerad struktur av en Zn(II)-jon omgärdad av sex vattenmolekyler. Bilden är gjord med VMD.²⁵

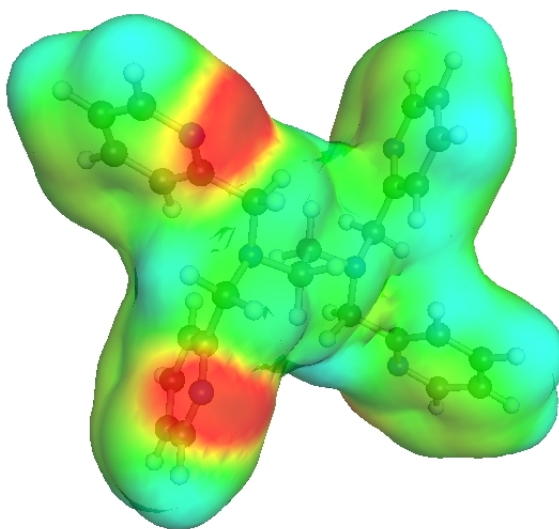
i vilka relativistiska effekter är relevanta, ersätts elektronerna i jonkärnan med så kallade effektiva kärnpotentialer (ECP). Dessa beskriver jonkärnans växelverkan med valenselektronerna och beaktar samtidigt relativistiska effekter.¹⁰⁴

Olika basset förkortas enligt vilken bassetserie de hör till. I detta arbete har Karlsruhe-basset använts, vilka betecknas def2-SVP, def2-DZVPP, def2-TZVPP och så vidare.¹⁰⁵ Karlsruhe-basset ger bra resultat med relativt få funktioner, vilket är orsaken till att de använts i denna avhandling.

4.6 Modeller för lösningsmedlet

Eftersom de flesta biokemiska reaktionerna sker i vattenlösning är det viktigt att kunna simulera lösningsmedlet i beräkningarna. Det finns olika strategier för detta och det bästa alternativet beror till en del på det studerade systemet och frågeställningen.

Det självklara sättet att modellera lösningen är att inkludera lösningsmedelsmolekyler i beräkningarna. Lösningsmedlet beskrivs då *explicit*. För kvantkemiska beräkningar är denna strategi dock sällan möjlig, eftersom även den minsta molekylen omgärdad av lösningsmedelsmolekyler ökar beräkningstiden så drastiskt att beräkningen inte kan utföras inom en rimlig tid. Detta gäller även för enskilda joner såsom Zn(II)-jonen som studeras i detta arbete. Det är inte heller självklart hur många lösningsmedelsmolekyler,



Figur 4.2: Den vattentillgängliga ytan för TPEN beräknad med COSMO. Bilden är gjord med TmoleX.¹⁰⁶

som är vattenmolekyler i detta fall, det behövs för att beskriva systemet. Ett enda solvateringsskikt (Fig. 4.1) räcker knappast, speciellt med tanke på att zink är en Lewis-syra som polariserar vattenmolekyler. Med ett ökat antal vattenmolekyler ökar också antalet frihetsgrader och därmed även beräkningstiden. Dessutom finns det många olika vattenstrukturer som bidrar till energin. Dessa borde beaktas exempelvis med hjälp av molekylodynamiska metoder.

En annan strategi är att inte inkludera explicita lösningsmedelsmolekyler, utan att modellera omgivningen på något annat mera approximativt sätt. Man brukar då säga att lösningsmedlet beaktas *implicit*. Ett exempel på en implicit lösningsmedelsmodell är COSMO (*conductor-like screening model*), som har använts för att simulera lösningsmedelseffekter i denna avhandling.¹⁰⁷ COSMO simulerar lösningsmedlet genom att introducera en kontinuerlig dielektrisk omgivning runt systemet (Fig. 4.2). På detta sätt kan en vattenomgivning beaktas på ett approximativt sätt utan att man behöver inkludera ett stort antal beräkningstidskrävande vattenmolekyler. Notera

att implicita lösningsmedelsmodeller såsom COSMO inte klarar av att reproducera ett lösningsmedels alla egenskaper. En viktig effekt som man på detta sätt går miste om är lösningsmedlets termodynamiska effekter såsom entropin. COSMO klarar inte heller av att modellera en hydraterad metalljon. Optimeringen av Zn(II) omgiven av enbart ett implicit lösningsmedel beskriver inte koordinationen och laddningsförskjutningar som sker mellan vattenmolekylerna och metallen.

4.7 Beräkning av termodynamiska storheter

En kvantkemisk strukturoptimering ger den lokala strukturen som har den lägsta elektroniska energin för den studerade molekylen. Ofta är man även intresserad av termodynamiska storheter vid högre temperaturer, såsom Gibbs fria energi för en viss reaktion. Den statistiska mekaniken bildar bryggan mellan kvantmekaniken och termodynamiken. Den grundläggande funktionen inom den statistiska mekaniken är fördelningsfunktionen q . Från q kan man erhålla många termodynamiska storheter, såsom entalpin H , entropin S och Gibbs fria energi G , vilka är av central betydelse inom kemin och biokemin. Fördelningsfunktionen skrivs som en summa av exponentiella termer över alla kvanttillstånd i :

$$q = \sum_i^{\infty} e^{-\epsilon_i/kT}, \quad (4.10)$$

där ϵ_i är energin för tillståndet i , k är Boltzmanns konstant och T är den absoluta temperaturen.

För att kunna beräkna q för en molekyl måste man känna till alla kvanttillstånd som molekylen kan ha. För en isolerad molekyl kan dessa erhållas inom stel-rotor-harmonisk-oscillator (RRHO) -approximationen. Totalenergin för en molekyl kan då approximeras som en summa av translationsenergin, rotationsenergin, vibrationsenergin och den elektroniska energin, vilket innebär att fördelningsfunktionen kan skrivas som en produkt av motsvaran-

de termer. Entalpin och entropin beror på logaritmen av q , vilket innebär att även dessa kan skrivas som summor av de enskilda bidragen:

$$\begin{aligned}\epsilon_{tot} &= \epsilon_{trans} + \epsilon_{rot} + \epsilon_{vib} + \epsilon_{el} \\ q_{tot} &= q_{trans} q_{rot} q_{vib} q_{el} \\ H_{tot} &= H_{trans} + H_{rot} + H_{vib} + H_{el} \\ S_{tot} &= S_{trans} + S_{rot} + S_{vib} + S_{el}.\end{aligned}\tag{4.11}$$

Translationsbidraget till fördelningsfunktionen kan beräknas medelst *partikeln i lådan* -modellen, vilket innebär att molekylvikten M är den enda nödvändiga molekylära informationen. Då blir q_{trans} i atomära enheter

$$q_{trans} = \left(\frac{MkT}{2\pi} \right)^{\frac{3}{2}} V, \tag{4.12}$$

där $\frac{h}{2\pi} = 1$ gäller och där V är volymen och h är Plancks konstant. Rotationsbidraget till fördelningsfunktionen kan inom stel-rotor-approximationen beräknas utgående från atomvikterna och molekylgeometrin som

$$q_{rot} = \frac{(2\pi kT)^{\frac{3}{2}} \sqrt{ABC}}{\sigma \pi}, \tag{4.13}$$

där A , B och C är tröghetsmoment i atomära enheter och σ är en konstant som korregerar för bidrag som beaktats flera gånger på grund av molekylens symmetri. Det enklaste sättet att beskriva molekylens vibrationella frihetsgrader är att approximera dem med harmoniska oscillatorer. Potentialen för en harmonisk oscillator fås från den klassiska mekaniken enligt

$$E(\Delta r) = \frac{1}{2} k \Delta r^2, \tag{4.14}$$

där Δr är avvikelser från jämviktsläget och k är kraftkonstanten. Genom att utveckla en Taylor-serie av energin kring jämviktsgeometrin kan man se att kraftkonstanten k är andra derivatan av energin i avseende på Δr . För en molekyl består k av en matris som innehåller alla andra derivator av energin

i avseende på avvikelserna från jämviktsgeometrin. Vibrationsbidraget till q blir

$$q_{vib} = \prod_i \frac{1}{1 - e^{-\nu_i/kT}}, \quad (4.15)$$

där ν_i är frekvensen för vibrationen i .

I FreeH-programmet, som är del av TURBOMOLE,¹⁰⁸ beräknas den kemiska potentialen utgående från fördelningsfunktionen enligt

$$\mu = ZPE - RT \ln(q_{trans} q_{rot} q_{vib}), \quad (4.16)$$

där ZPE är nollpunktsenergin för vibrationerna och R är gaskonstanten. Då μ adderas till den elektroniska energin erhåller man Gibbs fria energi G för molekyl. Då man beräknat skillnaden i Gibbs fria energi mellan reaktanterna och produkterna kan man erhålla reaktionens jämviktskonstant enligt $K = e^{-\Delta G/RT}$.

Inom denna approximation är uttrycket för totalenergin ϵ_{tot}

$$\epsilon_{tot} = ZPE + 3RT + \frac{\sum_i \epsilon_i (1 + e^{-\epsilon_i/kT})}{2(1 - e^{-\epsilon_i/kT})}. \quad (4.17)$$

Entalpin H och entropin S fås från totalenergin enligt $H = \epsilon_{tot} + RT$ och $S = (\epsilon_{tot} + RT - \mu)/T$.

Kapitel 5

Material och metoder

5.1 Material

Utgångspunkten för beräkningarna var kristallstrukturerna för Zn(II)-komplexet med TPEN och för den fria TPEN-molekylen.^{109,110} De övriga studerade molekylerna preparerades genom att modifiera de ovannämnda strukturerna med molekyleditorn av TmoleX (version 3.4),¹⁰⁶ som är en del av TURBOMOLE-programmet.

5.2 Beräkningskemiska metoder

I detta arbete utfördes densitetsfunktionalteoretiska (DFT) beräkningar på zinkkomplexen. TURBOMOLE-programmet (version 6.5) användes för alla strukturoptimeringar.¹⁰⁸ Molekylstrukturerna optimerades med meta-GGA-funktionalen TPSS, eftersom den har tidigare gett pålitliga resultat vid studier av zinkkomplex.^{100,101} Karlsruhe-basset av trippel- ζ -kvalitet utvidgat med polariseringsfunktioner (def2-TZVPP) användes för de flesta beräkningarna.¹⁰⁵ Effektiva kärnpotentialer användes för att beskriva kvicksilver.¹¹¹ Om inte annat nämns användes Grimmes D3-korrektion för att beskriva dispersionsväxelverkan.⁹⁷ Den omgivande vattenlösningen simulerades med

hjälp av COSMO-modellen med en dielektrisk konstant på 80.¹⁰⁷ Identitetsupplösningsmetoden (*resolution of the identity*, RI) med nödvändiga hjälpbasset utnyttjades för att försnabba beräkningarna. Vibrationsfrekvenserna beräknades numeriskt med TURBOMOLE:s NumForce-modul. Termodynamiska data vid 293 K beräknades medelst FreeH-modulen som ingår i TURBOMOLE. Partiaalladdningar beräknades med hjälp av NBO (*natural bond orbital*)-referensramen.¹¹² Bilderna av de optimerade molekylnstrukturerna är gjorda med VMD.²⁵

Reaktionsenergier beräknades på TPSS/def2-TZVPP-nivån både med och utan D3-korrekturen och COSMO, för att se hur modeller för att inkludera dispersionsväxelverkan respektive lösningsmedlet påverkar resultaten. Vid undersökningen av det beräkningskemiska protokollet användes förutom TPSS också BP86-funktionalen för att kontrollera hur mycket resultaten beror på val av funktional.^{98,99} Med BP86 användes alltid D3-korrekturen och COSMO, medan reaktionsenergier beräknades både med def2-TZVPP och def2-SVP-basset.¹⁰⁵ Detta gjordes delvis för att uppskatta storleken av bassetfelet och delvis för att se om ett mindre antal basfunktioner kan ge hyfsade resultat. Beräkningarna på BP86-D3/def2-SVP-nivån gjordes för att undersöka om liknande metoder kunde användas för större molekyler i framtida studier.

Kapitel 6

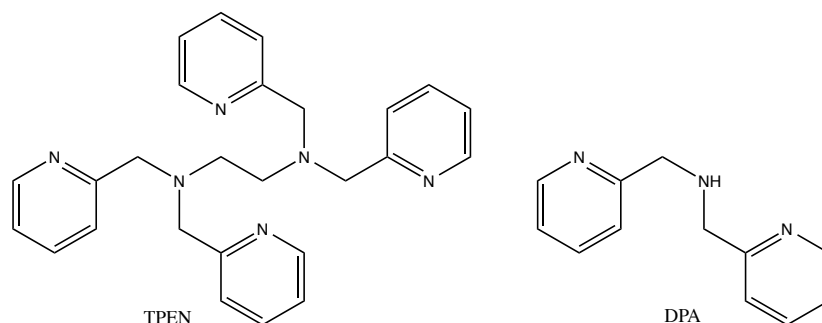
Resultat och diskussion

6.1 Metodvalidering

Ett av målen med detta arbete var att utveckla ett beräkningsprotokoll som kan användas vid studier av zinkkomplex och vid konstruktion av kelatorer. Reaktionsenergier beräknades på ett antal teorinivåer och jämfördes med experimentella data för att undersöka huruvida de densitetsfunktionalteoretiska (DFT) metoderna lämpar sig för studier av dessa system.⁸

6.1.1 Komplexering versus utbyte

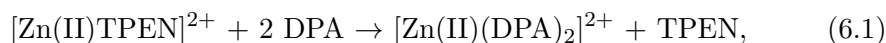
Beräkning av energin för en komplexeringsreaktion, där den fria metalljonen i vattenlösning reagerar med liganden och bildar ett komplex, kräver att energin beräknas för zinkjonen omgärdad av vatten. Detta är problematiskt på grund av flera orsaker som diskuterades i tidigare kapitel. Problemet kan lösas genom att beräkna reaktionsenergin för en ligandutbytesreaktion i stället för en komplexeringsreaktion. Då undviker man att modellera zinkjonen i vattenlösning, eftersom utbytesreaktionen kan skrivas som en summa av en komplexeringsreaktion och en dissocieringsreaktion. På detta sätt kan man eliminera den fria zinkjonen från reaktionsuttrycket.



Figur 6.1: De kemiska strukturerna för TPEN och DPA. Två DPA-molekyler bildar ett liknande Zn(II)-komplex som TPEN.

6.1.2 TPEN och DPA

För att kontrollera beräkningsmetodiken användes reaktionen



där DPA betecknar bis(2-pyridylmetyl)amin (Fig. 6.1). Den experimentella reaktionsenergin för Ekv. 6.1 är 4,34 kcal/mol vid 293 K.⁸ Ökningen i den fria energin beror på kelateffekten, som gynnas av den högre entropin för utgångsämnen. De beräknade resultaten är sammanfattade i Tabell 6.1. Notera att för att kunna modellera kelateffekten måste reaktionens entropibidrag beaktas. I Tabell 6.2 anges förändringen i den elektroniska energin och i Gibbs fria energi, i vilken entropin ingår, för reaktionen. Man kan tydligt se att om enbart den elektroniska energin beaktas fås en kvalitativt fel bild av reaktionens spontanitet.

DPA kan tänkas vara som en halv TPEN-molekyl, som har delats genom att ta bort den centrala etylkedjan (Fig. 6.1). Vid utbytet av liganderna förändras därmed koordinationsomgivningen obetydligt, eftersom två DPA-molekyler bildar ett komplex med zink som är mycket likt TPEN-komplexet. Denna isodesmiska reaktion (i en isodesmisk reaktion är bindningstyperna likadana för produkterna och reaktanterna)¹² möjliggör en kancellering av

Tabell 6.1: Reaktionsenergies vid 293 K för Ekv. 6.1 beräknade på olika teorinivåer är jämförda med det experimentella värdet. Om inte annat nämns har COSMO med $\epsilon = 80$ använts.

Metod	ΔG (kcal/mol)	
	Beräknad	Avvikelse från experiment
TPSS-D3/def2-TZVPP	5,56	1,22
TPSS/def2-TZVPP	9,91	5,57
TPSS-D3/def2-TZVPP/vakuum	7,43	3,09
BP86-D3/def2-TZVPP	4,42	0,08
BP86-D3/def2-SVP	3,05	-1,29
Experiment	4,34	-

fel, vilket ökar resultatens noggrannhet.

I de följande avsnitten diskuteras olika approximationers inverkan på resultaten.

6.1.3 Funktioner och basset

Reaktionsenergierna för Ekv. 6.1 beräknade på TPSS-D3/def2-TZVPP och BP86-D3/def2-TZVPP-nivån var 5,56 kcal/mol respektive 4,42 kcal/mol. Värdena avviker därmed från det experimentella värdet med 1,22 kcal/mol respektive 0,08 kcal/mol (Tabell 6.1). Man brukar ha som mål att nå "kemisk noggrannhet" i beräkningarna, vilket motsvarar ett fel på 1 kcal/mol. Med tanke på detta stämmer energierna mycket väl överens med det experimentella värdet. Bättre resultat kan inte förväntas med DFT-metoder.

Resultaten tyder på att de DFT-metoder som beaktar dispersion och som behandlar lösningsmedlet implicit är tillräckligt noggranna för studier av den här sortens reaktioner. Gibbs fria energi, vars entropibidrag beräknades från de harmoniska vibrationsfrekvenserna, stämmer väl överens med det

Tabell 6.2: Förändring i elektronisk energi och i Gibbs fria energi (i kcal/mol) vid 293 K för Ekv. 6.1. Värdena är beräknade på TPSS-D3/def2-TZVPP/COSMO-nivån.

	ΔE	ΔG
Beräknad	-5,13	5,56
Experiment	-	4,34

experimentella värdet.⁸

Bassetstorlekens betydelse studerades genom att beräkna en reaktionsenergi på BP86-D3/def2-SVP-nivån. Den beräknade energin är i det fallet 3,05 kcal/mol, vilket skiljer sig med -1,29 kcal/mol från det experimentella värdet. Reaktionsenergin är 1,37 kcal/mol mindre än när def2-TZVPP-basset användes. Resultatet är hyfsat med tanke på hur mycket snabbare beräkningen med det mindre bassetet är. Detta betyder att större ligand-system kan studeras på BP86-D3/def2-SVP-nivån utan att resultaten blir mycket onoggrannare.

6.1.4 Beräkningar med implicit lösningsmedelsmodell

Beräkningar på TPSS-D3/def2-TZVPP-nivån utan att beakta lösningsmedelseffekter medelst COSMO ger en reaktionsenergi på 7,43 kcal/mol. Reaktionsenergin på TPSS-D3/def2-TZVPP-nivån ökar således med 1,87 kcal/mol då reaktionen simuleras i vakuum. Avvikelsen från det experimentella värdet är 1,22 kcal/mol med COSMO och 3,09 kcal/mol utan. Resultaten tyder på att COSMO kan simulera vattenomgivningen i ligandutbytesreaktioner rätt väl, men att andra modeller för att beskriva solvationen borde även undersökas.

6.1.5 Behandling av dispersionskrafter

När man inte beaktar dispersionseffekter medelst D3-korrekturen fås en avvikelse på 5,57 kcal/mol från det experimentella värdet. Detta är in-

te förvånansvärt eftersom de använda DFT-metoderna inte ensamma kan behandla dispersionsväxelverkan. Dessutom visar resultaten att betydande intramolekylära dispersionseffekter förekommer i molekylerna, särskilt i Zn(II)-komplexen där atomerna kommer närmare varandra än i de fria liganderna (Fig. 6.2). Man bör alltså beakta dispersionseffekter om man strävar efter reaktionsenergier med tillfredställande noggrannhet.

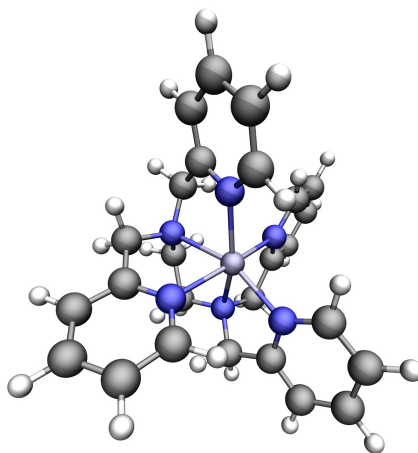
6.1.6 Det slutliga protokollet

Det slutliga beräkningsprotokollet är:

1. Strukturoptimering av reaktant- och produktmolekylerna på TPSS-D3/def2-TZVPP-nivån. Lösningsmedlet, som är vatten, beaktas implicit med COSMO ($\epsilon = 80$).
2. Vibrationsfrekvenserna beräknas numeriskt med NumForce-modulen i TURBOMOLE, eftersom att komplexen är stora och NumForce är väl ämnad för parallelldatorer. Analytiska frekvenser kan dessutom inte beräknas med TURBOMOLE då COSMO används.
3. Den kemiska potentialen vid en given temperatur beräknas medelst FreeH-modulen i TURBOMOLE. Den kemiska potentialen adderas till den elektroniska energin för att ge Gibbs fria energi.
4. Reaktionsenergierna beräknas genom att subtrahera reaktanternas Gibbs fria energi från produkternas.

Studier av andra metaller

Analogt studier av samma komplex med andra metaller ger information om kelatorns förmåga att binda olika metaller. I fall det finns experimentella data tillgängligt kan man även undersöka hur väl beräkningsmetoden klarar av att behandla andra metallkomplex. För att utreda detta undersöktes



Figur 6.2: Den DFT-optimerade strukturen för $[\text{Zn(II)TPEN}]^{2+}$. Zn(II)-jonen är hexakoordinerad i en oktaedrisk struktur.

TPEN och $(\text{DPA})_2$ -komplex med mangan(II) och kvicksilver(II) med samma protokoll som zinkkomplexen. Mn(II) antogs vara i kvartett-spinntillstånd. Reaktionsenergier beräknades enligt:

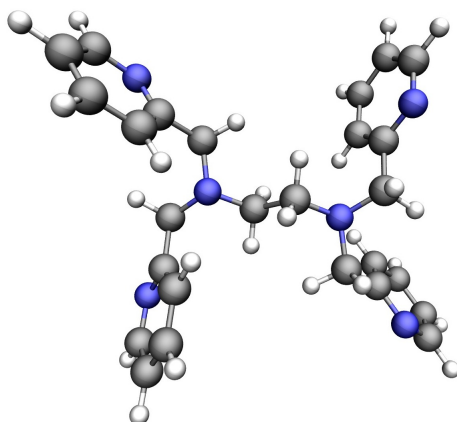


där M betecknar Hg(II) eller Mn(II).

För Hg(II) och Mn(II) avviker energierna för utbytesreaktionen med 1,81 kcal/mol respektive -0,27 kcal/mol från de experimentella värdena.⁸ Även för Hg(II) och Mn(II) är noggrannheten inom det förväntade energiintervallet för den använda beräkningsmetodologin, vilket betyder att även dessa metaller kan studeras med samma beräkningsprotokoll.

6.2 TPEN och modifierade kelatorer

Beräkningarna visar att TPEN hexakoordineras till zink med en aningen förvrängd oktaedrisk struktur (Fig. 6.2). Den fria liganden (Fig. 6.3) når sin jämviktsstruktur då den har en utsträckt konformation, där två av pyridylkvävena är på motsatta sidor av molekylén.

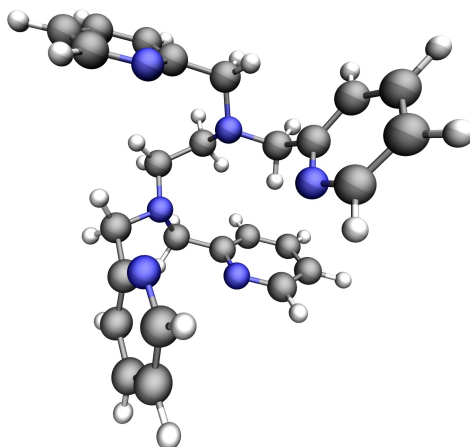


Figur 6.3: Den optimerade strukturen för den fria TPEN-liganden. Den lägsta energin erhålls då pyridylkvävena är på molekylens motsatta sidor.

För att kunna uppnå en kvantitativ beräkningsnoggrannhet är det viktigt att konformationen för den fria liganden är det globala energiminimet. Den ursprungliga strategin för att optimera den fria liganden var att utgå från komplexet genom att avlägsna zinkjonen och sedan optimera molekylgeometrin. Detta ledde emellertid till en ligandstruktur, där alla kvävena befinner sig på samma sida av molekylen (Fig. 6.4). Den beräknade energin för Ekv. 6.1 var i detta fall 20,78 kcal/mol, vilket är 16,44 kcal/mol större än det experimentella värdet. Denna stora avvikelse tydde på att någon av molekylstrukturerna inte motsvarade den verkliga fysikaliska situationen.

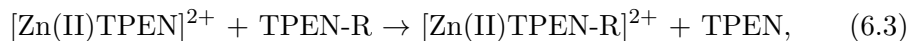
Genom att börja optimeringen av den fria liganden utgående från dess kristallstruktur erhöles en konformation (Fig. 6.3) med en lägre energi. Då kunde den experimentella energin i det närmaste reproduceras. Detta illustrerar vikten av att undersöka huruvida de optimerade strukturerna är vid lokala eller globala energiminima.

När det bekräftades att DFT-metoderna lämpar sig för denna typ av studier beräknades energin för TPEN-derivat (Fig. 6.5). Diverse elektronattraherande och elektrondonerande substituent introducerades på pyridylringarna, varefter Gibbs fria energi i förhållande till TPEN beräknades.



Figur 6.4: Den optimerade geometrin för TPEN med komplexets ligandstruktur som utgångsgeometri. Strukturen är inte vid ett globalt minimum. En lägre energi fås då molekylen har en mera utsträckt konformation (se Fig. 6.3).

Energierna motsvarar reaktionsenergier för ligandutbytet från TPEN till den modifierade liganden enligt:

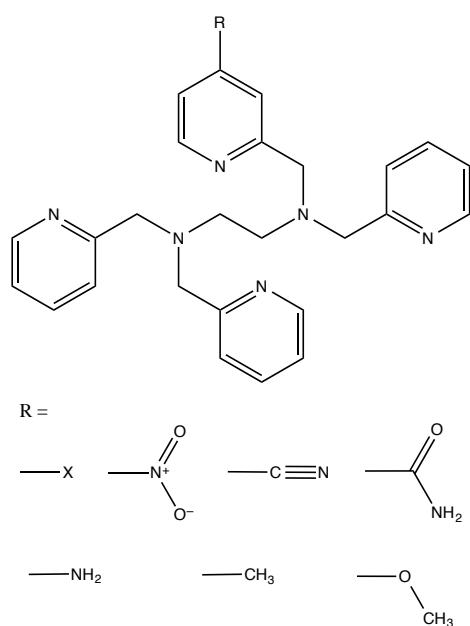


där TPEN-R är den modifierade kelatorn. Resultaten är sammanfattade i Tabell 6.3. Ett positivt värde innebär att Gibbs fria energi ökar i reaktionen. Detta betyder att den modifierade kelatorn bildar ett labilare komplex eller att den är stabilare som fri ligand. Båda fallen leder till en lägre zinkaffinitet.

För att uppskatta de absoluta komplexeringsenergierna adderades de beräknade relativa energierna till det experimentella värdet för komplexeringsreaktionen med TPEN. Jämviktskonstanterna för komplexeringsreaktionerna är beräknade utgående från denna semiempiriska reaktionsenergi.

6.2.1 Allmänna observationer

Förutom för den metylerade TPEN-molekylen, som diskuteras nedan, ändrades molekylernas konformation inte avsevärt (Fig. 6.6) vid substitutioner. Alla andra kelatorer har därmed liknande molekylgeometrier som i Fig. 6.2



Figur 6.5: TPEN och modifierade TPEN-ligander. För TPEN är R=H. Den övre raden R-grupper innehåller elektronattraherande substituent, där X är halogenerna F, Cl, I och Br. De övriga substituenterna i den övre raden är nitro-, nitril- och amidgrupper. Den nedre raden består av amin-, metyl- och metoxigrupper. Molekyler med två stycken F- eller CH₃-grupper gjordes genom att substituera den motsvarande väteatomen på den pyridylring som är motsatt (den nedersta ringen i figuren) till den redan substituerade ringen.

och Fig. 6.3. Därför visas inte strukturerna av alla kelatorer och komplex som optimerats i detta arbete. Det faktum att konformationerna inte förändras avsevärt vid substitution tyder också på att de beräknade energiskillnaderna inte beror i första hand på förändringar i konformationsenergin.

Partielladdningar för Zn-jonen och den substituerade pyridylgruppens kväveatom beräknades för att studera hur de elektronattraherande grupperna påverkar bindningen mellan kelatorn och metalljonen. Om bindningsstyrkan beror främst på elektrostatisk växelverkan kan bindningsenergin uppskattas medelst Coulombs lag. Resultaten för uppskattningen är sammanfattade i Tabell 6.4. De beräknade elektrostatiska energierna är jämförda med energin för det osubstituerade TPEN-komplexet. De elektrostatiska energierna följer samma trend som Gibbs fria energi i Tabell 6.3.

På grund av jämviktskonstantens exponentiella beroende på Gibbs fria energi har små variationer i ΔG en stor inverkan på K , vilket innebär att de beräknade jämviktskonstanterna i Tabell 6.3 har mycket stora felgränser. Detta illustreras genom att betrakta K för komplexeringsreaktionen med 2 DPA. Det experimentella värdet är $1,41 \cdot 10^{12}$, vilket skiljer sig nästan med en storleksordning från det beräknade värdet på $2,72 \cdot 10^{11}$.

6.2.2 Substituenten på pyridylringarna

Substituerade ligander byggdes genom att byta ut en väteatom på en av pyridylringarna till en annan substituent. Substituenterna tillsattes i *para*-position till pyridylringens kväveatom (Fig. 6.5).

Halogenering

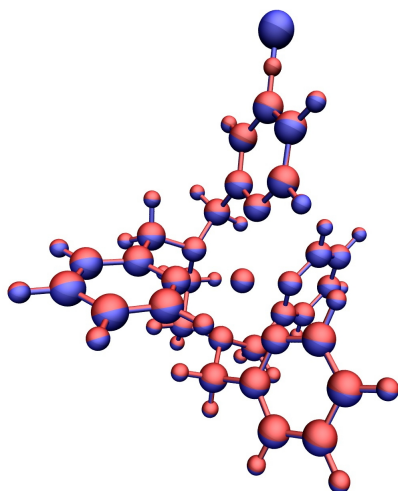
Halogenernas elektronegativa karaktär gör att elektrondensitet dras bort från donorkvävet i ringen, vilket försvagar kväveatomens Lewis-basiskhet. Då binder liganden zink med en lägre affinitet än den osubstituerade TPEN-molekylen. Denna effekt observerades med alla halogensubstituenten som un-

Tabell 6.3: Beräknade Gibbs fria energier (i kcal/mol) och uppskattade jämviktskonstanter för de substituerade liganderna. Temperaturen är 293 K. De experimentella K och ΔG -värdena för osubstituerat TPEN används som referensvärde. Gibbs fria energier för de substituerade TPEN-komplexen erhöles genom att addera den beräknade relativa energin till den experimentella reaktionsenergin för det osubstituerade TPEN-komplexet. Jämviktskonstanterna är uppskattade utgående från de beräknade Gibbs fria energierna.

R-grupp	$\Delta G(\text{relativ})$	$\Delta G(\text{absolut})$	K
H	0,00	-20,89	$3,83 \cdot 10^{15}$
F	1,46	-19,43	$3,10 \cdot 10^{14}$
Cl	1,76	-19,13	$1,85 \cdot 10^{14}$
Br	2,25	-18,64	$8,03 \cdot 10^{13}$
I	2,40	-18,49	$6,25 \cdot 10^{13}$
2 F	3,12	-17,77	$1,81 \cdot 10^{13}$
nitro	4,40	-16,49	$2,01 \cdot 10^{12}$
amid	1,90	-18,99	$1,45 \cdot 10^{14}$
nitril	4,87	-16,02	$8,87 \cdot 10^{11}$
metyl	1,18	-19,71	$5,06 \cdot 10^{14}$
2 metyl	-1,43	-22,32	$4,49 \cdot 10^{16}$
amin	-3,92	-24,81	$3,21 \cdot 10^{18}$
metoxi	-0,60	-21,49	$1,08 \cdot 10^{16}$
arsinin	12,18	-8,71	$3,15 \cdot 10^6$
pyrazin	3,74	-17,15	$6,25 \cdot 10^{12}$
pyrimidin	3,80	-17,09	$5,64 \cdot 10^{12}$
triazin	6,99	-13,90	$2,35 \cdot 10^{10}$

Tabell 6.4: NBO-partialladdningar (i atomära enheter) för Zn-jonen och donorkvävet hos den substituerade pyridylringen. Bindningsavståndet mellan dem, den uppskattade Coulomb-energin (V) och bindningsenergin i jämförelse med osubstituerad TPEN i % är också angivna.

R-grupp	$q(\text{Zn})$	$q(\text{N})$	$r(\text{\AA})$	$V(\text{kcal/mol})$	$V/V_{\text{TPEN}}(\%)$
H	1,6586	-0,5774	2,121	-1,872	100,00
F	1,6588	-0,5809	2,127	-1,879	100,33
Cl	1,6590	-0,5740	2,129	-1,855	99,05
Br	1,6591	-0,5733	2,127	-1,855	99,05
I	1,6591	-0,5730	2,128	-1,853	98,94
nitro	1,6591	-0,5405	2,151	-1,729	92,33
nitril	1,6591	-0,5467	2,145	-1,754	93,65
amid	1,6590	-0,5625	2,129	-1,818	97,07
pyrazin	1,6571	-0,5295	2,150	-1,692	90,39
pyrimidin	1,6565	-0,5887	2,143	-1,887	100,78
triazin	1,6551	-0,3316	2,151	-1,058	56,51



Figur 6.6: Superposition av joderad Zn-TPEN (blå) och det osubstituerade Zn-TPEN-komplexet (röd). Bilden visar att strukturerna är praktiskt taget identiska, vilket tyder på att förändringen i zinkaffinitet beror mera på elektroniska än på konformationella faktorer. Koordinationsbindningarna är bortlämnade.

dersöktes. De F, Cl, Br och I -substituerade TPEN-molekylernas komplexeeringsenergi steg med 1,46 kcal/mol; 1,76 kcal/mol; 2,25 kcal/mol respektive 2,40 kcal/mol. En tydlig minskning i bindningsaffiniteten observeras då man rör sig nedåt i det periodiska systemet. För att vidare studera effekten av halogenering preparerades en molekyl med två fluoratomer på motsatta pyridylringar. I detta fall steg energin till 3,12 kcal/mol relativt till TPEN, vilket är mera än en fördubbling av energin jämfört med den enkelt fluorerade molekyl.

Halogenering tycks försvaga bindningen mellan den substituerade pyridylringens kväve och zinkjonen. För att bekräfta detta undersöktes vibrationsfrekvenserna för bindningens töjningsrörelser (Tabell 6.5). Vågtalet (i cm^{-1}) för den osubstituerade TPEN och substituenterna med F, Cl, Br och I är 142, 137, 134, 132 och 130. Trenden är alltså den samma som för bindningsenergierna, vilket tyder på att halogenerna försvagar bindningen mellan pyridylkvävet och zinkjonen.

Tabell 6.5: Vibrationsvågtalet för töjningen av Zn(II)-N -bindningen mellan zinken och den substituerade pyridylringen. Vågtalet är direkt proportionellt till bindningsenergin.

R-grupp	Vågtalet (cm^{-1})
H	142
F	137
Cl	134
Br	132
I	130

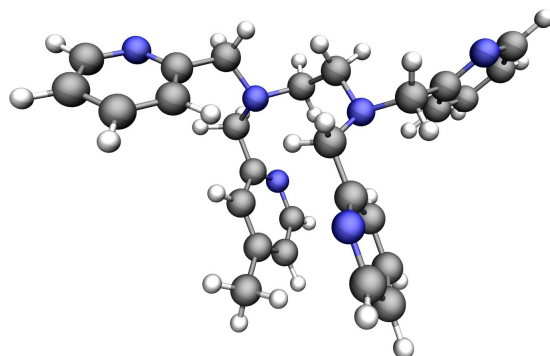
Resultaten visar att halogenering kunde vara en fungerande strategi när man vill sänka Zn(II)-affiniteten. Detta kan vara en delorsak varför clioquinol (Fig. 3.2) har en lämplig zinkaffinitet. Clioquinol innehåller både en jod- och en kloratom på ringstrukturen.

Andra elektronattraherande grupper

Substituering med andra elektronattraherande grupper ökade komplexeringsenergin i jämförelse med TPEN; nitril- och nitrogrupperna ökade energin med 4,87 kcal/mol respektive 4,40 kcal/mol, medan substitution med en amidgrupp ledde till en energiökning på 1,90 kcal/mol. Detta tyder på att även substitution med dessa grupper kan sänka zinkaffiniteten.

Elektrondonerande grupper

Energetiken vid substitution av en väteatom mot grupper som anses öka metallaffiniteten undersöktes också. Metyl-, amin- och metoxigrupperna är elektrondonerande grupper som kunde förväntas stabilisera bindningen till metallen i jämförelse med den osubstituerade kelatorn. Substitution med en amingrupp ledde till en avsevärd förändring på -3,92 kcal/mol i komplexe-

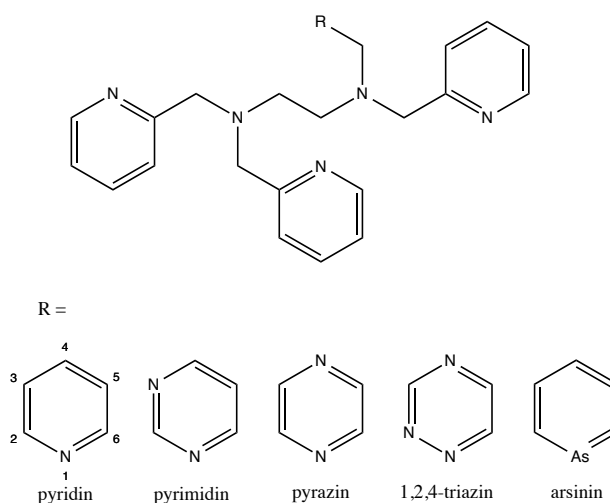


Figur 6.7: Den optimerade strukturen för metylerad TPEN. Två av pyridylringarna växelverkar via dispersionskrafter och stabiliserar den fria liganden. Detta leder till att komplexeringen missgynnas energetiskt.

ringsenergin, medan metoxigruppens effekt var endast $-0,60$ kcal/mol.

Intressant var att en metylgrupp ökade komplexeringsenergin med $1,18$ kcal/mol, vilket vid en första anblick hade en motsatt effekt till den förväntade. En närmare granskning av den optimerade strukturen avslöjade orsaken till det oförväntade resultatet. Metylgruppen förorsakade en förändring i den fria ligandens konformation (Fig. 6.7). Två av pyridylringarna växelverkar via dispersionskrafter. Dessutom observerades en vätebindning mellan en väte- och en kväveatom. Den konformationella förändringen ledde till en stabilisering av den fria kelatorn, vilket översteg metylgruppens elektrondonerande effekt.

Då två metylgrupper substituerades på motsatta pyridylringar blev energiskillnaden $-1,43$ kcal/mol, vilket tyder på att komplexbildningen gynnas. I detta fall är den fria kelatorn i en mera utsträckt konformation, som liknar den struktur som den osubstituerade TPEN-molekylen har (Fig. 6.3). I det här fallet hölls konformationsenergin för den fria kelatorn ungefär oförändrad vid metylering. Därför framgår metylgruppens elektronattraherande effekt på komplexeringsenergin.



Figur 6.8: Modifierade ligander med olika ringstrukturer. Då R är en pyridinring är det fråga om den osubstituerade TPEN-molekylen. Ringarna är bundna till resten av molekylen via kol nummer 6 i ringen.

Resultaten som erhöles med de metylsubstituerade TPEN-kelatorerna illustrerar hur flera sammanverkande faktorer kan leda till oväntade resultat. Förutom substituentens elektrondonerande eller elektronattraherande karaktär måste man också beakta hur substituenten steriskt påverkar den fria kelatorns energiminimum och växelverknings inom molekylerna. Detta betyder att man kan förändra zinkaffiniteten genom att stabilisera den fria liganden eller också genom att destabilisera komplexet via manipulering av den elektrostatiske växelverkan mellan metallen och kelatorn.

6.2.3 Andra ringstrukturer

Kelatorns ringstruktur modifierades genom att byta ut donoratomen mot tyngre atomer i samma grupp i det periodiska systemet eller genom att ersätta pyridylringens kolatomer med kväven (Fig. 6.8).

Di- och triaziner

Att byta ut en av kolatomerna i pyridylringarna mot ett kväve är en strategi som har använts för att förändra metallaffiniteten för metallextraherande ligander. I detta fall ökade komplexeringsenergin (Tabell 6.3) då kolatomer ersattes med kväve på en av ringarna. När man ersatte en av pyridylringarna med en pyrazinyling (som har en ytterligare kväveatom i *para*-position till donorkvävet) ökade energin med 3,74 kcal/mol. En pyrimidinyling (där den andra kväveatomen är i *meta*-position till donorkvävet) hade en liknande effekt och ledde till en ökning i komplexeringsenergin på 3,80 kcal/mol. Effekten av en tredje kväveatom i ringstrukturen undersöktes genom att ersätta en av pyridylringarna med en 1,2,4-triazinyling. I det fallet steg energin med 6,99 kcal/mol jämfört med den osubstituerade TPEN-molekylen. Att byta ut kolatomer med kväven i pyridylringarna tycks vara en effektiv strategi om man vill sänka bindingsaffiniteten.

Arsininringar

Arsen är i regel inte ett grundämne som man vill föra in i kroppen, men det kan vara nyttigt att undersöka hur komplexeringsenergin påverkas av att byta ut en av TPEN:s donorkväven mot en arsenatom. När donorkvävet byttes mot en arsenatom steg komplexeringsenergin med 12,18 kcal/mol, vilket innebär att man skapat en kelator som knappt binder zink i jämförelse med TPEN. Detta visar att donoratomens karaktär spelar en viktig roll. Den förhållandevist mjuka arsenatomen växelverkar mycket svagt med zinkjonen i komplexet.

6.3 Metodologins begränsningar

Den kvantkemiska metodologin förser oss med information om de studerade molekylernas elektronstruktur, men det finns andra egenskaper som meto-

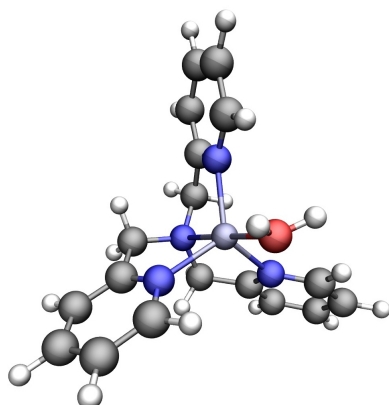
derna inte ännu kan modellera. Nedan diskuteras några aspekter som inte beaktades i denna avhandling.

6.3.1 Kelatorns biologiska effekt och syntes

En allvarlig begränsning hos *in silico* -metoder är svårigheten att förutsäga hur det eventuella läkemedlet reagerar i kroppen och om det är giftigt eller inte. Det är inte realistiskt att förvänta sig att man utgående från en kvantkemisk studie kan uppskatta en kelators möjliga giftiga egenskaper. I detta arbete har inga sådana förutsägelser gjorts. I stället har allmänna trender i bindningsaffiniteterna undersökts för att identifiera lovande inriktningar för mera utförliga studier. Svårigheter som kan uppstå när man försöker syntetisera kelatorerna har inte heller undersökts i detta arbete.

6.3.2 Modifiering av koordinationstalet

Nyligen publicerades en studie av TPA (Fig. 3.3) som en zinkkelator i biologisk forskning och därför undersöktes också TPA i denna avhandling.⁸⁴ TPA binder zink i en pentakoordinerad geometri, där fyra av liganderna är kväveatomer från kelatorn och en av liganderna är en vattenmolekyl (Fig 6.9). Även om beräkningar liksom experiment anger att TPA har en lägre zinkaffinitet än TPEN, var de beräknade resultaten inte i kvantitativ överensstämmelse med experiment. Den beräknade Gibbs fria energin för utbytet från $[\text{Zn(II)TPEN}]^{2+}$ till $[\text{Zn(II)(H}_2\text{O)(TPA)}]^{2+}$ var 19,51 kcal/mol medan det experimentella värdet är 6,19 kcal/mol.⁸ Detta beror dels på den förändrade zinkkoordinationen i jämförelse med TPEN. Svårigheterna med att noggrannt beräkna komplexeringsenergier för system med olika koordinationstal visar att det krävs en bättre beräkningsmetodik att tackla sådana frågeställningar. Därför har studierna begränsats till komplex med samma koordinationstal i denna avhandling.



Figur 6.9: Optimerad molekylstruktur för $[\text{Zn}(\text{II})(\text{H}_2\text{O})(\text{TPA})]^{2+}$.

6.3.3 Protonöverföringsreaktioner

I biologiska system är det en stor fördel om både komplexet och den fria ligan den är neutrala. Det naturligaste sättet att konservera laddningen är att kombinera metalljonens komplexeringsreaktion med en frigörning av protoner. Kvantkemiska simuleringar av laddningsneutrala komplexeringsreaktioner är synnerligen problematiska och har av denna orsak inte studerats i avhandlingen.

Kapitel 7

Sammanfattning och framtidsplaner

I denna avhandling utfördes DFT-beräkningar på TPEN-derivat. Termodynamiska storheter beräknades på RRHO-nivån utgående från DFT-data. Resultaten visar att dispersionskorrigerade DFT-metoder med en implicit lösningsmedelsmodell kan ge Gibbs fria energier för ligandutbytesreaktioner som är i bra överensstämmelse med experimentella data när termodynamiska effekter beaktas.

Beräkningarna visar att substitution med elektronattraherande grupper sänker TPEN:s zinkaffinitet. Svagt elektrondonerande grupper, såsom en metylgrupp, kan sänka zinkaffiniteten genom att stabilisera den fria kelatorn, vilket visar att flera olika faktorer kan samverka och leda till oförväntade komplexeringsenergier. Dessa resultat föreslår att flera av TPEN-derivaten som undersökts i detta arbete och andra TPEN-liknande kelatorer förtjänar en noggrannare undersökning.

Svårigheterna med beräkningarna på kelatorer med lägre denticitet avslöjar vissa av beräkningsmetodikens begränsningar. Ny beräkningsmetodik måste utvecklas för att tackla komplexeringsreaktioner som är laddningsneutrala och som involverar olika denticiteter. Ett sätt att åstadkomma

en kelator med en lägre zinkaffinitet kunde vara att utreda närmare hur entropieffekter påverkar komplexeringsreaktionen, eftersom beräkningarna visade att entropin spelar en viktig roll. Det vore också värdefullt att kunna beräkna absoluta komplexeringsenergier. Sådana beräkningar kräver en noggrann teoretisk beskrivning av solvatiserade metalljoner, vilket kunde vara till stor nytta också vid andra tillämpningar. Ytterligare kunde den beräkningsmetodik som presenterats i denna avhandling förfinas och användas vid undersökningar av hur kelatorns metallspecifitet kan justeras.

Litteraturförteckning

- [1] A. P. Smith och N. M. Lee, *Role of zinc in ALS*, Amyotroph. Lateral Sc. **8** (2007) 131.
- [2] A. I. Bush och R. E. Tanzi, *Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis*, Neurotherapeutics **5** (2008) 421.
- [3] K. J. Barnham och A. I. Bush, *Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases*, Curr. Opin. Chem. Biol. **12** (2008) 222.
- [4] C. Rodríguez-Rodríguez, M. Telpoukhovskaia, och C. Orvig, *The art of building multifunctional metal-binding agents from basic molecular scaffolds for the potential application in neurodegenerative diseases*, Coord. Chem. Rev. **256** (2012) 2308.
- [5] J.-M. Lee, Y.-J. Kim, H. Ra, S.-J. Kang, S. Han, J.-Y. Koh, och Y.-H. Kim, *The involvement of caspase-11 in TPEN-induced apoptosis*, FEBS lett. **582** (2008) 1871.
- [6] L. M. Canzoniero, P. Manzerra, C. T. Sheline, och D. W. Choi, *Membrane-permeant chelators can attenuate Zn²⁺-induced cortical neuronal death*, Neuropharmacology **45** (2003) 420.
- [7] J. Kim, T.-Y. Kim, J. J. Hwang, J.-Y. Lee, J.-H. Shin, B. J. Gwag, och J.-Y. Koh, *Accumulation of labile zinc in neurons and astrocytes*

- in the spinal cords of G93A SOD-1 transgenic mice*, Neurobiol. Dis. **34** (2009) 221.
- [8] G. Anderegg, E. Hubmann, N. G. Podder, och F. Wenk, *Pyridinderivate als Komplexbildner. XI. Die Thermodynamik der Metallkomplexbildung mit Bis-, Tris-und Tetrakis [(2-pyridyl) methyl]-aminen*, Helv. Chim. Acta **60** (1977) 123.
- [9] R. J. Radford och S. J. Lippard, *Chelators for investigating zinc metalloneurochemistry*, Curr. Opin. Chem. Biol. **17** (2013) 129.
- [10] G. E. Moore et al., *Cramming more components onto integrated circuits*, 1965.
- [11] N. N. Greenwood och A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements*, volume 1, Pergamon press, 1984.
- [12] International Union of Pure and Applied Chemistry, *IUPAC Gold Book*, IUPAC, 2006.
- [13] H. Vahrenkamp, *Why does nature use zinc-a personal view*, Dalton Trans. (2007) 4751.
- [14] W. Maret och Y. Li, *Coordination Dynamics of Zinc in Proteins*, Chem. Rev. **109** (2009) 4682.
- [15] F. A. Cotton, G. Wilkinson, C. A. Murillo, och M. Bochmann, *Advanced inorganic chemistry*, volume 5, Wiley New York, 1988.
- [16] R. Crichton, *Biological inorganic chemistry*, Elsevier Science, 2012.
- [17] R. G. Pearson, *Hard and soft acids and bases*, J. Am. Chem. Soc. **85** (1963) 3533.

- [18] R. A. Colvin, W. R. Holmes, C. P. Fontaine, och W. Maret, *Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis*, Metallomics **2** (2010) 306.
- [19] B. L. Vallee och D. S. Auld, *Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes*, Proc. Nat. Acad. Sci. **87** (1990) 220.
- [20] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, och A. Rosato, *Counting the zinc-proteins encoded in the human genome*, J. Proteome Res. **5** (2006) 196.
- [21] W. Maret, *New perspectives of zinc coordination environments in proteins*, J. Inorg. Biochem. **111** (2012) 110.
- [22] S. F. Sousa, A. B. Lopes, P. A. Fernandes, och M. J. Ramos, *The Zinc proteome: a tale of stability and functionality*, Dalton Trans. (2009) 7946.
- [23] J. Fraústo da Silva och R. Williams, *The biological Chemistry of the elements: The inorganic chemistry of life*, Oxford University Press Inc., New York, U.S.A., 2 edition, 2001.
- [24] M. S. Lee, G. P. Gippert, K. V. Soman, D. A. Case, och P. E. Wright, *Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain*, Science **245** (1989) 635.
- [25] W. Humphrey, A. Dalke, och K. Schulten, *VMD: visual molecular dynamics*, J. Mol. Graphics **14** (1996) 33.
- [26] A. Klug och D. Rhodes, *'Zinc fingers': a novel protein motif for nucleic acid recognition*, Trends Biochem. Sci. **12** (1987) 464.
- [27] R. W. Strange, S. Antonyuk, M. A. Hough, P. A. Doucette, J. S. Valentine, och S. S. Hasnain, *Variable metallation of human superoxide*

- dismutase: Atomic resolution crystal structures of Zn-Cu, Zn-Zn and as-isolated wild-type enzymes*, J. Mol. Biol. **356** (2006) 1152.
- [28] X. Chang, A. M. M. Jørgensen, P. Bardrum, och J. J. Led, *Solution structures of the R6 human insulin hexamer*, Biochemistry **36** (1997) 9409.
- [29] Y.-H. Kim och J.-Y. Koh, *The role of NADPH oxidase and neuronal nitric oxide synthase in zinc-induced poly (ADP-ribose) polymerase activation and cell death in cortical culture*, Exp. Neurol. **177** (2002) 407.
- [30] D. Voet och J. G. Voet, *Biochemistry*, John Wiley and Sons Inc., USA, 4 edition, 2011.
- [31] P. D. Zalewski, I. J. Forbes, och W. Betts, *Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn (II) using zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy) acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn (II).*, Biochem. J. **296** (1993) 403.
- [32] A. R. Kay och K. Toth, *Is zinc a neuromodulator?*, Sci. Signal. **1** (2008) re3.
- [33] S. Assaf och S.-H. Chung, *Release of endogenous Zn^{2+} from brain tissue during activity*, Nature **308** (1984) 734.
- [34] B. K. Bitanhirwe och M. G. Cunningham, *Zinc: The brain's dark horse*, Synapse **63** (2009) 1029.
- [35] P. A. Adlard, J. M. Parncutt, D. I. Finkelstein, och A. I. Bush, *Cognitive loss in zinc transporter-3 knock-out mice: a phenocopy for the synaptic and memory deficits of Alzheimer's disease?*, J. Neurosci. **30** (2010) 1631.

- [36] S. L. Sensi, P. Paoletti, J.-Y. Koh, E. Aizenman, A. I. Bush, och M. Hershfinkel, *The neurophysiology and pathology of brain zinc*, J. Neurosci. **31** (2011) 16076.
- [37] B. A. Messerle, A. Schäffer, M. Vašák, J. H. Kägi, och K. Wüthrich, *Three-dimensional structure of human [^{113}Cd] metallothionein-2 in solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy*, J. Mol. Biol. **214** (1990) 765.
- [38] W. Maret, *Redox biochemistry of mammalian metallothioneins*, J. Biol. Inorg. Chem. **16** (2011) 1079.
- [39] B. Masters, C. Quaife, J. Erickson, E. Kelly, G. Froelick, B. Zambrowicz, R. Brinster, och R. Palmiter, *Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles*, J. Neurosci. **14** (1994) 5844.
- [40] D. W. Hasler, L. T. Jensen, O. Zerbe, D. R. Winge, och M. Vašák, *Effect of the two conserved prolines of human growth inhibitory factor (metallothionein-3) on its biological activity and structure fluctuation: comparison with a mutant protein*, Biochemistry **39** (2000) 14567.
- [41] A. Krezel och W. Maret, *Dual nanomolar and picomolar Zn (II) binding properties of metallothionein*, J. Am. Chem. Soc. **129** (2007) 10911.
- [42] W. Maret och B. L. Vallee, *Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters*, Proc. Nat. Acad. Sci. **95** (1998) 3478.
- [43] L. M. Plum, L. Rink, och H. Haase, *The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health*, Int. J. Environ. Res. Public Health **7** (2010) 1342.

- [44] R. J. Cousins, J. P. Liuzzi, och L. A. Lichten, *Mammalian zinc transport, trafficking, and signals*, J. Biol. Chem. **281** (2006) 24085.
- [45] J.-Y. Lee, J. S. Kim, H.-R. Byun, R. D. Palmiter, och J.-Y. Koh, *Dependence of the histofluorescently reactive zinc pool on zinc transporter-3 in the normal brain*, Brain Res. **1418** (2011) 12.
- [46] D. Choi, M. Yokoyama, och J. Koh, *Zinc neurotoxicity in cortical cell culture*, Neuroscience **24** (1988) 67.
- [47] P. Manzerra, M. M. Behrens, L. M. Canzoniero, X. Q. Wang, V. Heindinger, T. Ichinose, S. P. Yu, och D. W. Choi, *Zinc induces a Src family kinase-mediated up-regulation of NMDA receptor activity and excitotoxicity*, Proc. Nat. Acad. Sci. **98** (2001) 11055.
- [48] V. Frazzini, E. Rockabrand, E. Mocchegiani, och S. Sensi, *Oxidative stress and brain aging: is zinc the link?*, Biogerontology **7** (2006) 307.
- [49] C. T. Sheline, A.-L. Cai, J. Zhu, och C. Shi, *Serum or target deprivation-induced neuronal death causes oxidative neuronal accumulation of Zn^{2+} and loss of NAD^+* , Eur. J. Neurosci. **32** (2010) 894.
- [50] S. D. Gower-Winter och C. W. Levenson, *Zinc in the central nervous system: from molecules to behavior*, Biofactors **38** (2012) 186.
- [51] D. Jiang, P. G. Sullivan, S. L. Sensi, O. Steward, och J. H. Weiss, *Zn^{2+} induces permeability transition pore opening and release of pro-apoptotic peptides from neuronal mitochondria*, J. Biol. Chem. **276** (2001) 47524.
- [52] K. Noh, Y. Kim, och J.-Y. Koh, *Mediation by membrane protein kinase C of zinc-induced oxidative neuronal injury in mouse cortical cultures*, J. Neurochem. **72** (1999) 1609.

- [53] C. T. Sheline, M. M. Behrens, och D. W. Choi, *Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD+ and inhibition of glycolysis*, J. Neurosci. **20** (2000) 3139.
- [54] J. J. Hwang, S.-J. Lee, T.-Y. Kim, J.-H. Cho, och J.-Y. Koh, *Zinc and 4-hydroxy-2-nonenal mediate lysosomal membrane permeabilization induced by H₂O₂ in cultured hippocampal neurons*, J. Neurosci. **28** (2008) 3114.
- [55] A. Bento-Abreu, P. Van Damme, L. Van Den Bosch, och W. Robberecht, *The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis*, Eur. J. Neurosci. **31** (2010) 2247.
- [56] M. C. Kiernan, S. Vucic, B. C. Cheah, M. R. Turner, A. Eisen, O. Hardiman, J. R. Burrell, och M. C. Zoing, *Amyotrophic lateral sclerosis.*, Lancet **377** (2011) 942.
- [57] C. M. Lill, O. Abel, L. Bertram, och A. Al-Chalabi, *Keeping up with genetic discoveries in amyotrophic lateral sclerosis: The ALSod and ALSGene databases*, Amyotroph. Lateral Sc. **12** (2011) 238.
- [58] O. Abel, *ALS online genetic database*, 2014.
- [59] A. Reaume, J. Elliott, E. Hoffman, N. Kowall, R. Ferrante, D. Siwek, H. Wilcox, D. Flood, M. Beal, R. Brown, R. Scott, och W. Snider, *Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury*, Nat. Genet. **13** (1996) 43.
- [60] L. Bruijn, M. Becher, M. Lee, K. Anderson, N. Jenkins, N. Copeland, S. Sisodia, J. Rothstein, D. Borchelt, D. Price, och D. Cleveland, *ALS-Linked SOD1 Mutant G85R Mediates Damage to Astrocytes and Promotes Rapidly Progressive Disease with SOD1-Containing Inclusions*, Neuron **18** (1997) 327.

- [61] J. S. Valentine och P. J. Hart, *Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100** (2003) 3617.
- [62] D. W. Cleveland och J. D. Rothstein, *From Charcot to Lou Gehrig: Deciphering selective motor neuron death in ALS*, Nat. Rev. Neurosci. **2** (2001) 806.
- [63] Y. Sheng, M. Chattopadhyay, J. Whitelegge, och J. Selverstone Valentine, *SOD1 Aggregation and ALS: role of metallation states and disulfide status*, Curr. Top. Med. Chem. **12** (2012) 2560.
- [64] A. I. Bush, *A Copper Binding Site within the Pathological Conformer Epitope of Mutant SOD1*, Front. Neurosci. **5** (2011) 97.
- [65] K. Hashimoto, Y. Hayashi, K. Watabe, T. Inuzuka, och I. Hozumi, *Metallothionein-III prevents neuronal death and prolongs life span in amyotrophic lateral sclerosis model mice*, Neuroscience **189** (2011) 293.
- [66] K. Puttaparthi, W. L. Gitomer, U. Krishnan, M. Son, B. Rajendran, och J. L. Elliott, *Disease Progression in a Transgenic Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Is Dependent on Both Neuronal and Non-Neuronal Zinc Binding Proteins*, J. Neurosci. **22** (2002) 8790.
- [67] K. P. Kepp, *Bioinorganic Chemistry of Alzheimer's Disease*, Chem. Rev. **112** (2012) 5193.
- [68] A. N. Istrate, P. O. Tsvetkov, A. B. Mantsyzov, A. A. Kulikova, S. A. Kozin, A. A. Makarov, och V. I. Polshakov, *NMR Solution Structure of Rat A β (1–16): Toward Understanding the Mechanism of Rats' Resistance to Alzheimer's Disease*, Biophys. J. **102** (2012) 136.
- [69] J.-Y. Lee, T. B. Cole, R. D. Palmiter, S. W. Suh, och J.-Y. Koh, *Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation*

- in human Swedish mutant APP transgenic mice*, Proc. Nat. Acad. Sci. **99** (2002) 7705.
- [70] M. Stoltenberg, M. Bruhn, C. Søndergaard, P. Doering, M. J. West, A. Larsen, J. Troncoso, och G. Danscher, *Immersion autometallographic tracing of zinc ions in Alzheimer beta-amyloid plaques*, Histochem. Cell Biol. **123** (2005) 605.
- [71] L. M. Miller, Q. Wang, T. P. Telivala, R. J. Smith, A. Lanzirotti, och J. Miklossy, *Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with β -amyloid deposits in Alzheimer's disease*, J. Struct. Biol. **155** (2006) 30.
- [72] J. Dong, C. S. Atwood, V. E. Anderson, S. L. Siedlak, M. A. Smith, G. Perry, och P. R. Carey, *Metal binding and oxidation of amyloid- β within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence*, Biochemistry **42** (2003) 2768.
- [73] C. Opazo, X. Huang, R. A. Cherny, R. D. Moir, A. E. Roher, A. R. White, R. Cappai, C. L. Masters, R. E. Tanzi, N. C. Inestrosa, et al., *Metalloenzyme-like Activity of Alzheimer's Disease β -Amyloid Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H_2O_2* , J. Biol. Chem. **277** (2002) 40302.
- [74] A. I. Bush, W. H. Pettingell, G. Multhaup, M. D. Paradis, J.-P. Vonsattel, J. F. Gusella, K. Beyreuther, C. L. Masters, och R. E. Tanzi, *Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc*, Science **265** (1994) 1464.
- [75] N. B. Cole, D. D. Murphy, J. Lebowitz, L. Di Noto, R. L. Levine, och R. L. Nussbaum, *Metal-catalyzed Oxidation of α -Synuclein helping to define the relationship between oligomers, protofibrils, and filaments*, J. Biol. Chem. **280** (2005) 9678.

- [76] G. Yamin, C. B. Glaser, V. N. Uversky, och A. L. Fink, *Certain metals trigger fibrillation of methionine-oxidized α -synuclein*, J. Biol. Chem. **278** (2003) 27630.
- [77] Y. Yang, T. Kawataki, K. Fukui, och T. Koike, *Cellular Zn^{2+} chelators cause "dying-back" neurite degeneration associated with energy impairment*, J. Neurosci. Res. **85** (2007) 2844.
- [78] K. J. Franz, *Clawing back: broadening the notion of metal chelators in medicine*, Curr. Opin. Chem. Biol. (2013).
- [79] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, och P. J. Feeney, *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*, Adv. Drug Delivery Rev. **23** (1997) 3.
- [80] R. A. Cherny, C. S. Atwood, M. E. Xilinas, D. N. Gray, W. D. Jones, C. A. McLean, K. J. Barnham, I. Volitakis, F. W. Fraser, Y.-S. Kim, et al., *Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β -amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice*, Neuron **30** (2001) 665.
- [81] E. Ferrada, V. Arancibia, B. Loeb, E. Norambuena, C. Olea-Azar, och J. P. Huidobro-Toro, *Stoichiometry and conditional stability constants of Cu (II) or Zn (II) clioquinol complexes; implications for Alzheimer's and Huntington's disease therapy*, Neurotoxicology **28** (2007) 445.
- [82] P. A. Adlard, R. A. Cherny, D. I. Finkelstein, E. Gautier, E. Robb, M. Cortes, I. Volitakis, X. Liu, J. P. Smith, K. Perez, et al., *Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial $A\beta$* , Neuron **59** (2008) 43.

- [83] A. Lakatos, É. Zsigó, D. Hollender, N. V. Nagy, L. Fülöp, D. Simon, Z. Bozsó, och T. Kiss, *Two pyridine derivatives as potential Cu (II) and Zn (II) chelators in therapy for Alzheimer's disease*, Dalton Trans. **39** (2010) 1302.
- [84] Z. Huang, X.-A. Zhang, M. Bosch, S. J. Smith, och S. J. Lippard, *Tris (2-pyridylmethyl) amine (TPA) as a membrane-permeable chelator for interception of biological mobile zinc*, Metallomics (2013).
- [85] A. Mousavi, *A chemical model for predicting zinc (II) binding by organic ligands as hypothetical therapeutic agents*, Med. Chem. Res. **22** (2013) 234.
- [86] C. Rodríguez-Rodríguez, A. Rimola, J. Alí-Torres, M. Sodupe, och P. González-Duarte, *In silico strategies for the selection of chelating compounds with potential application in metal-promoted neurodegenerative diseases*, J. Comput.-Aided Mol. Des. **25** (2011) 21.
- [87] A. Rimola, J. Alí-Torres, C. Rodríguez-Rodríguez, J. Poater, E. Matito, M. Sola, och M. Sodupe, *Ab initio design of chelating ligands relevant to Alzheimer's disease: Influence of metalloaromaticity*, J. Phys. Chem. A **115** (2011) 12659.
- [88] R. D. Hancock och L. J. Bartolotti, *A DFT analysis of the effect of chelate ring size on metal ion selectivity in complexes of polyamine ligands*, Polyhedron (2012).
- [89] R. D. Hancock, *The pyridyl group in ligand design for selective metal ion complexation and sensing*, Chem. Soc. Rev. **42** (2013) 1500.
- [90] M. Born och R. Oppenheimer, *Zur quantentheorie der molekeln*, Ann. Phys. **389** (1927) 457.

- [91] J. C. Slater, *The theory of complex spectra*, Phys. Rev. **34** (1929) 1293.
- [92] D. R. Hartree, *The wave mechanics of an atom with a non-Coulomb central field. Part I. Theory and methods*, Proc. Cambridge Phil. Soc. **24** (1928) 89.
- [93] J. C. Slater, *Note on Hartree's method*, Phys. Rev. **35** (1930) 210.
- [94] V. Fock, *Näherungsmethode zur Lösung des quantenmechanischen Mehrkörperproblems*, Z. Phys. **61** (1930) 126.
- [95] P. Hohenberg och W. Kohn, *Inhomogeneous electron gas*, Phys. Rev. **136** (1964) B864.
- [96] W. Kohn och L. J. Sham, *Self-consistent equations including exchange and correlation effects*, Phys. Rev. **140** (1965) A1133.
- [97] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, och H. Krieg, *A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu*, J. Chem. Phys. **132** (2010) 154104.
- [98] A. D. Becke, *Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior*, Phys. Rev. A **38** (1988) 3098.
- [99] J. J. Perdew, *Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas*, Phys. Rev. B **33** (1986) 8822.
- [100] J. Tao, J. P. Perdew, V. N. Staroverov, och G. E. Scuseria, *Climbing the Density Functional Ladder: Nonempirical Meta-Generalized Gradient Approximation Designed for Molecules and Solids*, Phys. Rev. Letters **91** (2003) 146401.

- [101] S. F. Sousa, E. S. Carvalho, D. M. Ferreira, I. S. Tavares, P. A. Fernandes, M. J. Ramos, och J. A. N. F. Gomes, *Comparative analysis of the performance of commonly available density functionals in the determination of geometrical parameters for zinc complexes*, J. Comput. Chem. **30** (2009) 2752.
- [102] A. D. Becke, *Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange*, J. Chem. Phys. **98** (1993) 5648.
- [103] C. Lee, W. Yang, och R. G. Parr, *Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density*, Phys. Rev. B **37** (1988) 785.
- [104] F. Jensen, *Introduction to computational chemistry*, Wiley, 2007.
- [105] F. Weigend och R. Ahlrichs, *Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy*, Phys. Chem. Chem. Phys. **7** (2005) 3297.
- [106] C. Steffen, K. Thomas, U. Huniar, A. Hellweg, O. Rubner, och A. Schroer, *TmoleX—A graphical user interface for TURBOMOLE*, J. Comput. Chem. **31** (2010) 2967.
- [107] A. Klamt och G. Schüürmann, *COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 (1993) 799.
- [108] R. Ahlrichs, M. Bär, M. Häser, H. Horn, och C. Kölmel, *Electronic Structure Calculations on Workstation Computers: The Program System TURBOMOLE*, Chem. Phys. Letters **162** (1989) 165, nyaste version: se <http://www.turbomole.com>.
- [109] C. A. Blindauer, M. T. Razi, S. Parsons, och P. J. Sadler, *Metal complexes of N, N, N', N'-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine*

- (*TPEN*): *Variable coordination numbers and geometries*, Polyhedron **25** (2006) 513.
- [110] T. Fujihara, M. Saito, och A. Nagasawa, *N, N, N', N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl)-1, 2-diaminoethane: a multidentate ligand*, Acta Crystallogr. Sect. E: Structure Reports Online **60** (2004) 262.
- [111] D. Andrä, U. Häussermann, M. Dolg, H. Stoll, och H. Preuss, *Energy-adjusted ab initio pseudopotentials for the second and third row transition elements*, Theor. Chim. Acta **77** (1990) 123.
- [112] J. Foster och F. Weinhold, *Natural hybrid orbitals*, J. Am. Chem. Soc. **102** (1980) 7211.